

---

**Diversität und Funktionen der mit der  
Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831)  
assoziierten Bakterien**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Biologie und Geografie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Sascha Eilmus  
aus Leverkusen  
März 2009

---

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Abteilung für Allgemeine Botanik der Universität Duisburg-Essen und an einer anderen gleichwertigen Einrichtung durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Heil
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bayer
3. Gutachter: Prof. Dr. Hynek Burda

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2009

---

*Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;  
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.*

Marie Curie

### Zusammenfassung

Der Ameisengattung *Pseudomyrmex* gehören zahlreiche Baum bewohnende Arten an, die z. T. unabhängig voneinander enge Mutualismen mit verschiedenen myrmekophytischen Pflanzen eingegangen sind. Dabei verteidigen die Ameisen ihre Wirtspflanze gegen Fraßfeinde. Wie war es möglich, dass sich innerhalb dieser Gruppe so oft Generalisten mit breitem Nahrungsspektrum zu z. T. hoch spezialisierten Pflanzenameisen mit rein pflanzlicher Ernährungsweise entwickeln konnten? Oftmals liegt der Schlüssel zum Verständnis spezialisierter phytophager Insekten in ihrem Mutualismus mit Mikroorganismen, die ihnen helfen, ihre Nahrung zu verdauen und diese durch Syntheseleistungen mit essentiellen Nährstoffen wie Aminosäuren und Sekundärstoffen wie z. B. Vitaminen anzureichern. Ist es daher möglich, dass es symbiotische Bakterien sind, die es aneztral räuberischen und generalistischen Ameisen ermöglicht haben, hoch spezialisierte Vegetarier zu werden? Als konkrete Problemstellungen ergaben sich hieraus folgende Fragen: Welche bakteriellen Gemeinschaften lassen sich in Vertretern der Gattung *Pseudomyrmex* überhaupt finden? Unterscheidet sich die Bakterienausstattung zwischen den Mutualisten und den parasitischen Ameisen? Was ist die Funktion der Bakterien? Ist die mit den Ameisen assoziierte Bakteriengemeinschaft vielleicht sogar in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren?

Um einen möglichst umfassenden Überblick über die mit *Pseudomyrmex* assoziierten Bakterien zu gewinnen, wurde eine Variante der tRFLP-Methode (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) unter Nutzung des Computerprogramms TReFID (Terminal Restriction Fragment Identifying Program) eingesetzt (Rösch und Bothe 2005, Rösch *et al.* 2006). Dabei werden nach einer spezifischen PCR zur Amplifikation des prokaryotischen 16S rRNA-Gens mit fluorochrommarkierten Primern die Amplifikate einem genau definierten Restriktionsverdau mit 13 verschiedenen Enzymen unterzogen. Die entstehenden terminalen markierten Fragmente werden von TReFID automatisch mit einer Prokaryoten-Datenbank abgeglichen und all diejenigen Mikroorganismen identifiziert, deren tRF-Muster (Restriktionsfragmentmuster) mit bekannten Datenbankeinträgen übereinstimmen. Diese Methode erlaubt eine qualitative Analyse der Diversität einer Bakteriengemeinschaft. Die tRFLP-Methode wurde auf drei Arten der Gattung *Pseudomyrmex* angewandt, die drei unterschiedliche Lebensweisen repräsentieren: mutualistische Pflanzenameise, opportunistischer Ameisenpflanzenparasit und generalistische Ameise. Ferner wurden die mutualistischen Akazien der Akazienameisen und einige myrmekophile Akazienarten untersucht und alternative mikrobiologische Verfahren

(Klonierung und Kultivierung) als Vergleichsmöglichkeit zur tRFLP-Methode herangezogen. Die mit den Ameisen assoziierte bakterielle Gesellschaft konnte dabei erfolgreich charakterisiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit den Ameisen assoziierte Bakteriengemeinschaft sehr viel diverser war, als bisherige Untersuchungen an anderen verwandten Ameisengattungen dies hätte vermuten lassen. Dabei dominierten die Gruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria und Bacteroidetes, die 90 % der Diversität der tRF-Muster darstellten. Zudem ähnelte die bakterielle Gemeinschaft sehr jener der Termiten. Da es sich bei der Biozönose des Termitendarms um eine Anpassung an defizitäre, einseitige Kost (Cellulose) handelt, konnte vermutet werden, dass eine derartige Funktion auch bei den Ameisen vorliegt. Es konnten viele Mikroorganismen nachgewiesen werden, die auf fermentative Prozesse und Stickstoff-Recycling im Darm der Ameisen schließen lassen. Die Beobachtung einer aktiven Ethin-Reduktion deutete auf aktive Nitrogenase und damit Stickstoff-Fixierung bei *P. gracilis* und *P. salvini* hin, dies konnte jedoch bislang mittels  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopenanalyse nicht bestätigt werden. Dafür ergaben die Daten der  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopenanalyse der Freilandproben von *P. salvini*, dass sich anders als bislang vermutet, diese Ameisenart *in situ* rein pflanzlich ernährt. Weitere Versuche insbesondere mit *P. ferrugineus*, *P. gracilis* aber auch weiteren arborealen und bekanntermaßen auf pflanzliche Kost, extrafloraler Nektar oder Honigtau spezialisierten Ameisenarten mit der  $^{15}\text{N}_2$ -Methode erscheinen als erforderlich, um endgültig Stickstoff-Fixierungskapazitäten von Ameisen und deren assoziierte Mikroorganismen aufdecken oder widerlegen zu können.

## Abstract

Ant-plant mutualisms represent a particular form of indirect defence of plants, since ants provide the defensive effect for plants against herbivorous animals. The neotropical arboreal ant genus *Pseudomyrmex* comprises many specialised inhabitants of myrmecophytes. Astonishingly, many of those ant species that are closely associated with plants have evolved independently from each other. How was the evolution of highly specialised vegetarian ant species from omnivorous ancestors possible? I hypothesise that microbial symbionts play a key role in the evolution of such ants, as it has already been described for insect herbivores. For example, the bacterial symbionts of Hemiptera and Isoptera synthesise amino acids, vitamins and digestive enzymes and might facilitate or impede the adaptive evolutionary diversification of the hosts. Hence, I addressed the following questions: How is the bacterial community composed that is associated to *Pseudomyrmex*? Are there any differences in the bacterial community between generalist, parasitic and mutualistic ants? What is the function of the bacterial community? Is the bacterial community associated with *Pseudomyrmex* capable of nitrogen fixation?

*In silico* analysis of terminal restriction fragments (tRF) of fluorochrome-labelled PCR products utilising the assignment tool TReFID (Rösch und Bothe 2005, Rösch *et al.* 2006) was used for the gross characterisation of the bacterial community in workers and larvae of *Pseudomyrmex salvini* (generalist), *P. gracilis* (facultative parasite of the *Acacia-Pseudomyrmex* mutualism) and *P. ferrugineus* (obligate mutualist). In short, TReFID applies *in silico* analysis of terminal restriction fragments (tRF) obtained from digestions of fluorochrome-labelled PCR products of the 16S rRNA gene with multiple restriction enzymes. The current database consists of 22.239 entries of the NCBI database ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The advantage of this approach is the ability to characterise the bacterial diversity in a cost-effective and time-saving manner. The tRFLP approach is based on fragment length analysis and stands in contrast to clone libraries with hundreds of single sequencing steps. After obtaining an overview of the bacterial diversity of a sample with the tRFLP approach it was possible to focus on bacteria of interest. The presence of different bacterial genera was independently confirmed via PCR and cultivation approaches.

The bacterial community associated with *Pseudomyrmex* turned out to be much more diverse than expected based on earlier studies on related ants. In all three ant species, the bacterial

community was dominated by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria and Bacteroidetes, which made up 90 % of tRF pattern diversity. The community structure was similar to the prokaryotic community of the hindgut of termites, another insect group that is adapted to a highly specialised diet. This similarity might indicate an adaptation of the investigated ants to a nutrient-deficient diet. Several of the bacteria identified in the present study might play a role in fermentation and N-recycling processes in the insect gut. Indeed, the observation of an active acetylene reduction indicated the presence of functioning nitrogenase in *P. gracilis* and *P. salvini*. However, consecutive stable isotope assays did not confirm an assimilation of atmospheric nitrogen by the ant organism, while data obtained on natural distributions of  $^{15}\text{N}_2$  indicated a strictly vegetarian diet of *P. salvini* under natural conditions. Further  $^{15}\text{N}_2$  experiments with *P. ferrugineus*, *P. gracilis* and other arboreal ants that are known to feed as direct (EFN, food bodies) or indirect (honeydew) phytophages will be required to investigate the possibility and capacity of N-fixation of ants and their associated microorganisms.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Martin Heil für die Betreuung meiner Arbeit, zu der ich erst durch dessen Forschung inspiriert wurde. Besonders danke ich für die vielen hilfreichen Hinweise und Kommentare zur Arbeit, für die Forschungsreise nach Mexiko sowie für die Teilnahme an der Tagung der ISCE in Pennsylvania, USA.

Herr Prof. Peter Bayer und Herrn Dr. Jensen danke ich besonders für das Korrekturlesen und die zahlreichen Anmerkungen und hilfreichen Hinweise zur Arbeit.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe „Allgemeine Botanik“ der Universität Duisburg-Essen, vor allem Beate Maarschalkerwerd, Susann Schiwy, Dr. Miriam de Roman Martinez, Dr. Herfried Kutzelnigg, Dr. Manfred Jensen, Michael Neugebauer, Dr. Ulrich Lion, und Dr. Daniel Ballhorn, für Hilfe und Unterstützung.

Ein besonderer Dank für moralische Unterstützung in jeder Form gebührt meinen beiden Kolleginnen Marcia Gonzalez Teuber und Stefanie Kautz, denen ich auf diesem Wege für die eigenen Dissertationen alles nur erdenklich Gute wünsche. Dabei gilt meine besonderer Dank Stefanie Kautz, ohne deren Erfahrung der Forschungsaufenthalt in Mexiko nur schwer vorstellbar gewesen wäre.

También quiero agradecer cordialmente la ayuda del Dr. Arturo Reyes Ramírez y de Edgar Eduardo Mendoza García, de la Universidad del Mar, Puerto Escondido, Oaxaca, México, ya que sin su apoyo el trabajo en el laboratorio de la Universidad del Mar no hubiera sido posible. = Ich möchte mich auch besonders herzlich für die Hilfe von Dr. Arturo Reyes Ramírez und Edgar Eduardo Mendoza Garcia von der Universidad del Mar, Puerto Escondido, Oax. México bedanken, die die Arbeit im Labor der Universidad del Mar ermöglichten.

Nicht zuletzt möchte ich Prof. Wilhelm Boland und besonders Dr. Stefan Bartram vom MPI of Chemical Ecology in Jena danken, die die Stickstoffisotopenanalyse durchführten.

Meiner lieben Mutter Ursula und meiner lieben Schwester Natascha danke ich, dass wir die vergangenen zwei Jahre trotz des schrecklichen und unerwarteten Verlustes zusammen überstanden haben. Ihr seid mir eine wichtige Stütze.

Meinen lieben Freunden Mike, Lex, André, Linda, Ralf, Kai, noch ein Kai, Andreas, Christian, Timm, Fabian samt Familie (und einigen weiteren mehr) danke ich für eure Geduld, für Ablenkung, Aufmunterung, für jeden Spaß und jeden Streit, für euer Vertrauen und eure Zuversicht.

Meinem lieben Freund Alexander möchte ich hier von Herzen für seine uneingeschränkte Solidarität und Liebe danken. Was wäre nur aus mir ohne deine zahllosen Aufmunterungen und Deine Hilfe geworden? Durch deine Liebe bin ich mir selbst mehr wert.

Diese Arbeit wurde durch ein DFG-Stipendium für Prof. Martin Heil finanziert und unterstützt.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Anlaß und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	1
1.2	Ameisen – Schlüsselrolle in den terrestrischen Ökosystemen .....	2
1.3	Mutualismen .....	3
1.4	Interaktion von Ameisen und Pflanzen .....	4
1.5	Interaktionen von Ameisen und Bakterien .....	5
1.6	Umweltbakterien“ – Diversität, Artbegriff, Bedeutung .....	7
1.7	Experimentelle Grundlagen .....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1	Probennahme und Handhabung .....	11
2.1.1	Blätter und Nektarien .....	12
2.1.2	Wurzelknöllchen .....	12
2.1.3	Ameisen und deren Larven .....	12
2.1.4	Kultivierung der Ameisen unter Laborbedingungen .....	13
2.1.5	Präparation des Ameisendarmtraktes .....	13
2.1.6	Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Anzahl CFU .....	13
2.2	Isolierungs- und Kultivierungsverfahren für Bakterien .....	13
2.2.1	Isolierung der Gesamtheit von Mikroorganismen aus Blattproben .....	13
2.2.2	Isolierung der Gesamtheit von Bakterien aus Ameisen .....	15
2.2.3	LB-Medium für <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.2.4	Medium für <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	15
2.2.5	Medium für <i>Pseudomonas syringae</i> .....	16
2.2.6	Medium für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	16
2.2.7	YEM-Medium für Anreicherungskulturen .....	16
2.2.8	YEM+-Medium .....	17
2.2.9	Modifiziertes YEM+ -Medium für Ameisendarmflora .....	17
2.2.10	Modifiziertes YEM+ -Medium für Rhizobien (nach DSMZ) .....	18
2.2.11	Stickstoffarmes Medium .....	18
2.2.12	Spurenelementlösung .....	19
2.2.13	Anzucht von Bakterien in Flüssignährmedien .....	19
2.2.14	Kultivierung von Bakterien auf Nährböden .....	20
2.2.15	Gellan-Platten .....	20
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	20
2.3.1	DNA-Präparation für molekularbiologische Analysen der Bakterienflora .....	20
2.3.2	PCR zur Amplifikation der Markergene aus Umwelt-DNA-Präparaten .....	20
2.3.3	PCR für t-RFLP-Ansätze .....	24
2.3.4	Restriktionsverdau der t-RFLP-Proben .....	24
2.3.5	Wasser für PCR .....	25

2.3.6	DNA-Fällung (für Plasmidaufarbeitung und PCR-Produktanreicherung).....	25
2.3.7	Agarose-Gel zur Elektrophorese .....	25
2.3.8	Isolierung der DNA aus einem Agarose-Gel .....	26
2.3.9	Klonbibliothek.....	26
2.4	Experimente zum Nachweis von N-Fixierung.....	30
2.4.1	Ethin-Reduktion zum Nachweis von Nitrogenase-Aktivität.....	30
2.4.2	Isotopenexperimente: Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$ .....	30
2.5	Datenauswertung mittels Computerprogrammen.....	32
2.5.1	Auswertung der Sequenzdaten .....	32
2.5.2	TReFID-Software.....	32
2.5.3	Bearbeitung und Aktualisierung der TReFID Referenzdatenbank .....	35
2.5.4	Statistik.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Mit Akazien assoziierte Bakterien .....	38
3.1.1	Auswertung der CFU-Bestimmung der Akazien .....	38
3.1.2	Bakterien auf und in Blättern sowie extrafloralen Nektarien.....	41
3.1.3	Wurzelknöllchensymbiosen der untersuchten Akazien .....	43
3.2	Mit den Ameisen assoziierte Bakterien.....	45
3.2.1	Auswertung der CFU-Bestimmung der Ameisen .....	45
3.2.2	Ergebnisse aus Kultivierung und Klonbibliothek .....	48
3.2.3	tRFLP-Analyse der mit den Ameisen assoziierten Bakteriengesellschaft.....	50
3.2.4	Vergleich der Bakteriengemeinschaften der Ameisenarten .....	76
3.3	Reproduzierbarkeit der tRFLP-Methode.....	81
3.4	Überprüfung von TReFID .....	83
3.5	Ethin-Reduktionstest .....	87
3.6	Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$ .....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1	Bakteriengemeinschaft der Ameisen.....	93
4.1.1	Bakterien und Insekten.....	93
4.1.2	Bakteriengemeinschaft der <i>Pseudomyrmex</i> .....	94
4.1.3	Bakterien der Akazien und Ameisen.....	96
4.1.4	Putative Funktionen der Bakterien von <i>Pseudomyrmex</i> .....	97
4.1.5	Hinweise auf putativ N-fixierende Bakterien.....	98
4.2	Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse .....	102
4.2.1	Gemeinsamkeiten von Ameisen und Termiten .....	102
4.2.2	Vorteile durch N-Fixierung bei Baum bewohnenden Ameisen .....	106
4.2.3	Vorteile durch N-Fixierung für obligate Akazienameisen.....	107

4.2.4	Wurzelknöllchensymbiosen der Ameisenkakazien.....	107
4.3	Beurteilung der experimentellen Verfahren.....	112
4.3.1	DNA-Isolierung aus Ameisen.....	112
4.3.2	Reproduzierbarkeit der tRFLP-Methode.....	112
4.3.3	tRFLP-Methode und TReFID .....	113
4.3.4	Ethin-Reduktions-Test .....	116
4.3.5	Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$ .....	117
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>142</b>
7.1	Positionsdaten der Proben .....	142
7.2	Auflistung aller verwendeten Lösungen .....	144
7.3	Arthropoda: <i>Pseudomyrmex salvini</i> .....	147
7.4	Fotografien .....	154
7.5	TReFID-Ergebnistabellen .....	159
<b>8</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>163</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>165</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1: Modellvorstellung des Ameise-Pflanze-Mutualismus .....	7
Abbildung 2.1: Lage der Probenahmestellen in Mexiko.....	11
Abbildung 2.2: Versuchsaufbau Stickstoffisotopenexperiment.....	32
Abbildung 2.3: Schema zur Verwendung von “TReFID” .....	34
Abbildung 2.4: Schema zur Auswertung von tRFLP-Daten mit TReFID .....	36
Abbildung 3.1: Anzahl der CFU pro 1 g Frischgewicht Pflanzenmasse der verschiedenen <i>Acacia</i> -Arten. ....	40
Abbildung 3.2: Reinfektion.....	44
Abbildung 3.3: CFU pro 1 g Frischgewicht <i>P. ferrugineus</i> und <i>P. gracilis</i> .....	47
Abbildung 3.4: Mittelwerte für die Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster für <i>Pseudomyrmex</i> <i>salvini</i> , <i>P. gracilis</i> und <i>P. ferrugineus</i> .....	51
Abbildung 3.5: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>ferrugineus</i> . ....	54
Abbildung 3.6: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>ferrugineus</i> – Proteobakterien hervorgehoben. ....	56
Abbildung 3.7: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der $\alpha$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> . ....	58
Abbildung 3.8: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der $\beta$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> . ....	59
Abbildung 3.9: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der $\gamma$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> . ....	60
Abbildung 3.11: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Divisionen aus der TReFID- Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex gracilis</i> . ...	65
Abbildung 3.12: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> .....	66
Abbildung 3.13: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> .....	67
Abbildung 3.14: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller $\alpha$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> .....	68
Abbildung 3.15: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller $\beta$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> .....	69
Abbildung 3.16: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller $\gamma$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex</i> <i>gracilis</i> .....	70
Abbildung 3.17: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Divisionen aus der TReFID- Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex salvini</i> . ....	73
Abbildung 3.18: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex salvini</i> . ....	74

Abbildung 3.19: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> , <i>P. gracilis</i> und <i>P. salvini</i> im Vergleich. ....	77
Abbildung 3.20: Vergleich der drei diversesten Proteobakterienklassen zwischen <i>P. ferrugineus</i> , <i>P. gracilis</i> und <i>P. salvini</i> .....	79
Abbildung 3.21: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> – Test auf Reproduzierbarkeit.....	82
Abbildung 3.22: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> – Test auf Reproduzierbarkeit.....	83
Abbildung 3.23: Verhältnis von irrtümlich identifizierten Taxa zur Anzahl der verwendeten Enzyme und zur absoluten Anzahl von Treffern und tRF-Mustern.....	84
Abbildung 3.24: Verhältnis von irrtümlich identifizierten Taxa zur Anzahl der verwendeten Enzyme und zur absoluten Anzahl von Treffern und tRF-Mustern.....	85
Abbildung 3.25: Dendrogramm der Datenbanksequenzen (Treffersequenzen) der TReFID-Analyse einer künstlich zusammengestellten Probe aus <i>Escherichia coli</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> und <i>Azospirillum brasilense</i> .....	86
Abbildung 3.26: Ethinreduktion bei Ameisen.....	88
Abbildung 3.27: Analyse des Anteils des stabilen Isotops <sup>15</sup> N bei <i>P. salvini</i> .....	89
Abbildung 3.28: Analyse des Anteils des stabilen Isotops <sup>15</sup> N bei <i>P. salvini</i> im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge. ....	90
Abbildung 3.29: Analyse des Anteils des stabilen Isotops <sup>15</sup> N bei <i>P. ferrugineus</i> im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge. ....	91
Abbildung 3.30: Analyse des Anteils des stabilen Isotops <sup>15</sup> N bei <i>P. gracilis</i> im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge. ....	92
Abbildung 4.1: Modellvorstellung Baum bewohnende Trophobionten-abhängige Ameise unter Einbeziehung möglicher N-Fixierung.....	106
Abbildung 4.2: Modellvorstellung des Ameise-Pflanze-Mutualismus unter Einbeziehung der Bakterien und (potenzieller) N-Fixierung.....	111
Abbildung 7.1: Ameisenakazien Südmexikos. ....	154
Abbildung 7.2: Ausschnitt aus der Lebensgemeinschaft um die Ameisenakazien Südmexikos. ....	155
Abbildung 7.3: <i>Acacia chiapensis</i> mit obligat mutualistischer Akazienameise <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> .....	156
Abbildung 7.4: Belt'sche Körperchen.....	157
Abbildung 7.5: Bakterienisolate.....	157
Abbildung 7.6: Bakterienisolate.....	158

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Bakterien in Blätter und Nektarien der Akazien .....	41
Tabelle 3.2: Aufstellung der mit den Akazien assoziierten Knöllchenbakterien .....	45
Tabelle 3.3: Identifizierte Bakterien der drei Ameisenarten .....	48
Tabelle 3.4: TReFID - Beste Treffer <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> .....	61
Tabelle 3.5: TReFID - Beste Treffer <i>Pseudomyrmex gracilis</i> .....	71
Tabelle 3.6: TReFID - Beste Treffer <i>Pseudomyrmex salvini</i> .....	75
Wertetabelle zu Abbildung 3.19 .....	78
Tabelle 3.7: Vergleich potenzieller Ameisensymbionten .....	80
Tabelle 3.8: Ethin-Reduktion .....	87
Tabelle 4.1: Habitate, Symbiosen und putative Funktionen der Bakterientaxa .....	100
Tabelle 4.2: Termitendarmflora. ....	108
Tabelle 7.1: Liste GPS-Koordinaten: Ameisen- und Pflanzenproben. ....	142
Tabelle 7.2: Beispiel einer TReFID-Ergebnisliste I .....	159
Tabelle 7.3: Beispiel einer TReFID-Ergebnisliste II .....	160
Tabelle 7.4: Beispiel einer TReFID-Ergebnisliste III. ....	161
Tabelle 7.5: Listenausschnitt - <i>Ribosomal Database Project II</i> .....	162

## Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
A	Adenin, Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
$\alpha$ -Proteobacteria	Alphaproteobacteria (Klasse)
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
b, bp	Base(n), Basenpaar(e)
$\beta$ -Proteobacteria	Betaproteobacteria (Klasse)
C	Cytosin, Cytidin
$\text{CaCO}_3$	Calciumcarbonat
$\text{CaCl}_2$	Calciumchlorid
CFU	Colony Forming Unit (Kolonie eines Mikroorganismus, der auf eine Spore/Zelle zurückgeführt werden kann)
$\text{CoCl}_2 (\text{x}6 \text{ H}_2\text{O})$	Kobalt(II)-chlorid (-hexahydrat)
$\text{CuCl}_2 (\text{x}2 \text{ H}_2\text{O})$	Kupfer(II)-chlorid (-dihydrat)
$\delta$ -Proteobacteria	Deltaproteobacteria (Klasse)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS; eng. für Säure: acid → DNA)
dNTP	Desoxyribonukleotid(e)
$\epsilon$ -Proteobacteria	Epsilonproteobacteria (Klasse)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure/-acetat
EFN	Extrafloraler Nektar
EtBr	Ethidiumbromid
$\text{FeCl}_2 (\text{x}4 \text{ H}_2\text{O})$	Eisen(II)-chlorid (-tetrahydrat)
$\text{FeSO}_4 (\text{x}7 \text{ H}_2\text{O})$	Eisen(II)-sulfid (-heptahydrat)
ft	Fuß (Längenmaß) = 30,48 cm
$\gamma$ -Proteobacteria	Gammaproteobacteria (Klasse)
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
G	Guanin, Guanidin
GPS	Global Positioning System
h	Stunde

## Abkürzungsverzeichnis

---

H <sub>2</sub>	Wasserstoff
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sup>+</sup>	Proton
KAc	Kaliumacetat
kb, kbp	Kilobase(n), Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
KNO <sub>3</sub>	Kaliumnitrat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kaliumcarbonat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid (wasserfrei; Kalilauge mit Wasser)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosylpyranosid
L	Liter
MgSO <sub>4</sub> (x7 H <sub>2</sub> O)	Magnesiumsulfat (-heptahydrat)
MnCl <sub>2</sub> (x4 H <sub>2</sub> O)	Mangan(II)-chlorid (-tetrahydrat)
MnSO <sub>4</sub> (x 1 H <sub>2</sub> O)	Mangan(II)-sulfat (-monohydrat)
min	Minute(n)
N-	Stickstoff-(z.B.-Kreislauf)
N <sub>2</sub>	Atmosphärischer Stickstoff (Distickstoff)
<sup>15</sup> N	Stabiles Isotop des Stickstoffs
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (x2 H <sub>2</sub> O)	Dinatriummolybdat (-dihydrat)
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid (wasserfrei; Natronlauge in Wasser)
NiCl <sub>2</sub> (x6 H <sub>2</sub> O)	Nickel(II)-chlorid (-hexahydrat)
nt	Nukleotid(e)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Natriumphosphat-Natriumchlorid-Puffer (eng.: phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng.: <i>polymerase chain reaction</i> )



## Abkürzungsverzeichnis

---

P <sub>i</sub>	Phosphat, anorganisch
RNA	Ribonukleinsäure (eng.: -acid → RNA)
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium-</i> )
T	Thymin, Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
T(t)-RFLP	Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
TReFID	Terminal Restriction Fragment Identifying Program
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Einheit der Enzymaktivität (eng.: <i>unit</i> )
U	Uracil
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
ZnSO <sub>4</sub> (x 7 H <sub>2</sub> O)	Zinksulfat (-heptahydrat)
% v/v	Volumenprozent (eng.: <i>volume per volume</i> )
% w/v	Massenprozent (eng.: <i>weight per volume</i> )

# 1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diversität der Mikroorganismenpopulation untersucht, die in Assoziation mit Pflanzenameisen der Gattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) im Süden Mexikos lebt. Neben einer deskriptiven Aufnahme der vorhandenen Mikroorganismen mit überwiegend molekularbiologischen Methoden wurden weitere Experimente durchgeführt, welche die potenzielle Bedeutung der nachgewiesenen Bakterien für die Ameise als Wirt und für das mutualistische System Akazie-Ameise-Bakterien aufklären sollten.

## 1.1 Anlaß und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zur neotropischen Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Pseudomyrmecinae) werden aktuell über 200 Arten gerechnet, unter denen obligat mutualistische Pflanzenameisen ebenso wie Generalisten (frei lebende, meist arboreale Ameisen mit kleinen Kolonien) vertreten sind (Ward und Downie 2005). Die Pflanzenameisen innerhalb der Gattung *Pseudomyrmex* haben sich dabei mindestens sechsmal unabhängig voneinander entwickelt (Ward und Downie 2005, Kautz *et al.* in press.). Wie war es möglich, dass sich innerhalb dieser Gattung mehrfach Generalisten mit breitem Nahrungsspektrum (Clement *et al.* 2008, Eilmus 2008, Kautz *et al.* in press.) zu z. T. hoch spezialisierten Pflanzenameisen mit rein vegetarischer Kost (Clement *et al.* 2008, Heil *et al.* 2005b) entwickelt haben? Phytophage Tiere und besonders Insekten sind stets untrennbar von Mikroorganismen – und besonders Bakterien – abhängig, die ihnen helfen die Nahrung zu verdauen und durch Syntheseleistungen mit essenziellen Nährstoffen und Sekundärstoffen anzureichern (Zientz *et al.* 2005, Douglas 2006, Behar *et al.* 2005, De Vries *et al.* 2008, Chandler *et al.* 2008, Hosokawa *et al.* 2006, König *et al.* 2007, Boursaux-Eude und Gross 2000, Pittman *et al.* 2008, Fukatsu *et al.* 2007, Kikuchi *et al.* 2005, Moran *et al.* 2005b, Shelton und Grace 2003, Janson *et al.* 2008). Ist es daher möglich, dass es symbiotische Bakterien anzestral räuberischen und generalistischen Ameisen ermöglicht haben, sich zu hoch spezialisierten Vegetariern zu entwickeln? Neben dieser lagen der Arbeit weitere Fragen zu Grunde: Welche bakteriellen Gemeinschaften finden wir in *Pseudomyrmex*? Unterscheidet sich die Bakteriengesellschaft zwischen dem Mutualisten und dem Parasiten? Was ist die Funktion der Bakterien? Ist die mit den Ameisen assoziierte Bakteriengemeinschaft vielleicht sogar in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu fixieren?

Hinweise darauf gibt es bereits bei *Tetraponera* (eine Schwestergattung zu *Pseudomyrmex*), *Dolichoderus* und *Echinopla* (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b).

Um einen möglichst umfassenden Überblick über die mit *Pseudomyrmex* assoziierten Bakterien zu gewinnen, wurde eine Variante der tRFLP-Methode (siehe Abschnitt 1.7) unter Nutzung des Computerprogramms TReFID verwandt (Rösch und Bothe 2005, Rösch *et al.* 2006). Diese tRFLP-Methode wurde auf die Arten *P. ferrugineus* (mutualistische Akazienameise), *P. gracilis* (fakultativer Parasit auf Ameisenakazien und auch Generalist) und *P. salvini* (Baum bewohnende Ameise ohne bekannte Assoziation zu Myrmekophyten) angewandt, wodurch die drei wesentlichen bekannten Lebensweisen (Akazienmutualist, fakultativer Akazienparasit und frei lebende arboreale Ameise = Generalist), die bei den Arten der Gattung *Pseudomyrmex* anzutreffen sind, abgedeckt wurden. Als Vergleich wurde der unmittelbare Lebensraum der Ameisen, die mutualistischen Akazien der Akazienameisen und einige myrmekophile Akazienarten, auf ihre bakterielle Diversität hin untersucht. Hierdurch konnte die Frage beantwortet werden, welche Bakterien spezifisch mit den Ameisen assoziiert und welche Bakterien im System aus Myrmekophyt und Ameise verbreitet sind.

## 1.2 Ameisen – Schlüsselrolle in den terrestrischen Ökosystemen

Ameisen (Hymenoptera, Formicidae) sind hoch entwickelte, eusoziale Insekten und stellen mit bislang ca. 12.000 beschriebenen Arten die artenreichste Gruppe sozialer Insekten überhaupt dar. Ameisen leben in fast allen terrestrischen Ökosystemen: Von den Polarkreisen bis zum Äquator und von Permafrostgebieten über die Wüsten bis hin in die tropischen Regenwälder werden alle Lebensräume besiedelt. In tropischen Regenwäldern können Ameisen sogar die dominierende Stellung unter den Tieren einnehmen. Stichprobensammlungen mit Insektizidverneblern in Amazonien und auf Borneo zeigten, dass 94 % der so gesammelten Arthropoden Ameisen waren, und dass sie 86 % der Biomasse dieser Proben stellen (Tobin 1995, Davidson 1997). Hochrechnungen erlauben die Schlussfolgerung, dass 15 % bis 20 % der terrestrischen, tierischen Biomasse auf Ameisen entfallen (Schultz 2000). Dieser Erfolg geht auf diverse Faktoren zurück. So entwickelten Ameisen eine Vielzahl von Lebensweisen, die es ihnen ermöglichte, viele verschiedene Nischen zu erobern. Diese Lebensweisen reichen von räuberischen Arten über omnivore bis hin zu herbivoren Spezies und vom Sozialparasitismus bis hin zu „Sklavenhalter-Ameisen“ (Dulosis). „Herbivore“ Blattschneideameisen nutzen allerdings das eingetragene

Pflanzenmaterial nicht direkt sondern kultivieren damit einen mutualistischen Pilz, der die Ameisen mit Futterkörperchen versorgt (Currie 2001a, Martin 1992, Mueller *et al.* 2001). Die primäre Kohlenstoffquelle vieler Ameisen stellen jedoch direkt oder indirekt von Pflanzen bezogene zuckerhaltige Lösungen dar: Ameisen nutzen Honigtau – die Ausscheidungen Phloemsaft saugender Insekten (Hemiptera) (Stadler und Dixon 2005, Way 1962, Ayre 1963) oder direkt von Pflanzen ausgeschiedenen extrafloralen Nektar (Bentley 1977, Heil und McKey 2003, Koptur 1992). Untersuchungen des Stickstoff-Isotopenverhältnisses von Ameisen machten deutlich, dass Ameisen in einem viel größeren Maße als bislang vermutet direkt oder indirekt herbivor leben (Davidson *et al.* 2003).

Neben diesen unspezifischen Assoziationen rücken in zunehmendem Maße aber solche Interaktionen ins Zentrum des Interesses, in denen spezifische Ameisenarten mit besonderen „Ameisenpflanzen“ assoziiert sind: Zahlreiche Pflanzenarten aus einer Vielzahl unterschiedlicher Gattungen und Familien sind dauerhaft von Ameisen besiedelt (siehe Abschnitt 1.3).

### 1.3 Mutualismen

Die Begriffe Mutualismus und Symbiose werden im deutschen Sprachgebrauch oft synonym verwendet. Beide Begriffe sind jedoch klar voneinander abgegrenzt. Unter einer Symbiose wird eine enge und meist über einen langen Zeitraum andauernde Interaktion zwischen zwei verschiedenen Arten verstanden (De Bary 1879), während es sich bei einem Mutualismus um eine Interaktion zwischen Organismen verschiedener Arten handelt aus der beide Seiten einen Fitness-Vorteil beziehen (Bronstein 1994).

Mutualismen sind keineswegs exotische Ausnahmen: Jede Spezies soll zumindest Anteil an einer mutualistischen Interaktion haben (Bronstein 2001). Selbst die Geschichte des Lebens an sich wurde entscheidend durch Mutualismen geprägt, beginnend mit dem Ursprung der eukaryotischen Zelle (Margulis 1996), der Besiedelung des Landes durch Pflanzen (Wang und Qiu 2006) und der Radiation der Angiospermen (Bronstein 2001, Matsuki *et al.* 2008, Hu *et al.* 2008, Janz und Nylin 1998, Krassilov und Rasnitsyn 1996, Ash 1996, Rasnitsyn und Krassilov 1996, Hougeneitzman und Rausher 1994). In Mutualismen werden in der Regel „Ressourcen“ oder „Dienstleistungen“ ausgetauscht. Da diese für beide Partner Kosten darstellen, gehen klassische evolutionäre Theorien davon aus, dass beide Partner die Kosten

so minimal wie möglich zu halten versuchen, bzw. auf der anderen Seite für die eigene Leistung die maximale Gegenleistung zu beziehen versuchen. Daher wird Mutualismus auch als eine Interaktion der gegenseitigen Ausbeutung aufgefasst (Herre *et al.* 1999, Janzen 1985, Connor 1995). Die Rolle der Bakterien im untersuchten mutualistischen System aus Ameise und Pflanze wurde bislang kaum bearbeitet. Während zahlreiche Mutualismen als Zwei-Partner-Systeme höherer Organismen mittlerweile gut verstanden sind, wurde die Rolle der Bakterien oft ignoriert. So ist beispielsweise auch vom hier untersuchten System aus Ameise und Pflanze bislang nicht bekannt, ob und in welchen ökologischen und physiologischen Kontext Bakterien als dritte Partner eine wesentliche Rolle für die Funktion und Stabilität der mutualistischen Interaktion spielen.

## 1.4 Interaktion von Ameisen und Pflanzen

Eine Vielzahl von Pflanzen interagiert direkt oder indirekt mit Ameisen (Beattie 1985, Heil und McKey 2003, Hölldobler und Wilson 1990). Am weitesten verbreitet sind hierbei Interaktionen zwischen Ameisen und Pflanzen, die zum indirekten Schutz der Pflanzen gegenüber Herbivoren und Pathogenen führen (Heil 2008). Werden Ameisen nur bei Bedarf angelockt (also nur dann, wenn die Pflanze von einem Pflanzenfresser attackiert wird), spricht man von myrmekophilen Pflanzen. Im Falle einiger subtropischer und tropischer Arten (z. B. *Macaranga tanarius* sowie verschiedene Leguminosen) konnte gezeigt werden, dass durch Fraß das Hormon Jasmonat (Jasmonsäure) produziert wird, welches bei den genannten Pflanzen die Produktion von Nektar an speziellen extrafloralen Nektarien induziert (Heil *et al.* 2001b, Heil 2004, Kost und Heil 2006, Heil 2008). Dieser Nektar, der auf den vegetativen Teilen der Pflanze sezerniert wird und nicht zur Bestäubung der Pflanze dient, lockt generalistische Ameisen sowie Wespen, Spinnen und andere karnivore Arthropoden an, welche dann die Pflanze von möglichen Herbivoren befreien können (Dicke *et al.* 1990, Way und Khoo 1992, Loughrin *et al.* 1995, Thaler 1999, Heil *et al.* 2001a, Heil *et al.* 2002, Ness 2003, Heil 2008). Solche extrafloralen Nektarien sind derzeit von Pflanzen aus 119 Familien und 739 Gattungen mit 3996 Arten beschrieben (Keeler 2008, Keeler 1980, Keeler 1979). Während myrmekophile Pflanzen den extrafloralen Nektar zur Etablierung fakultativer Mutualismen mit meist nicht näher angepaßten Ameisen sezernieren, bezeichnet man als echte Ameisenpflanzen (Myrmekophyten) solche Arten, die dauerhaft mit Ameisen assoziiert leben (Heil 2008, Heil und McKey 2003). Myrmekophyten bieten den Ameisen spezielle Wohnkammern (Domatien) an, die bei den verschiedenen Pflanzenfamilien aus ganz

unterschiedlichen Organen hervorgegangen sein können. Oft bieten diese Pflanzen auch spezifische Nahrung in Form von EFN oder von speziellen Futterkörperchen an, um im Gegenzug permanent durch die Ameisen gegen Herbivore und/oder Konkurrenzvegetation geschützt zu sein (Brown 1960). Die Pflanze bietet also Ressourcen und erfährt im Gegenzug durch die Ameisen eine Dienstleistung (Verteidigungsverhalten). Bei den hier untersuchten Ameisenakazien (*Acacia* u. a.) sind die Stipulardornen stark vergrößert, langlebig, später verholzt und mit einem schwammigen Mark gefüllt. Nahe der Spitze des Dorns befindet sich eine dünnwandige Stelle, durch welche die Ameisen den Dorn besiedeln können (Janzen 1974). Darüber hinaus stellen myrmekophytische *Acacia*-Arten den sie besiedelnden Ameisen extrafloralen Nektar und protein- und lipidhaltige Futterkörperchen zur Verfügung, welche als Belt'sche-Körperchen (nach dem Erstbeschreiber) bezeichnet werden (Belt 1874, Rickson 1980, Rickson 1971). Für die jeweils assoziierten Ameisenarten stellen diese Futterkörperchen offensichtlich die alleinige Nahrung der Larven und Königin dar (Heil *et al.* 1998, Clement *et al.* 2008).

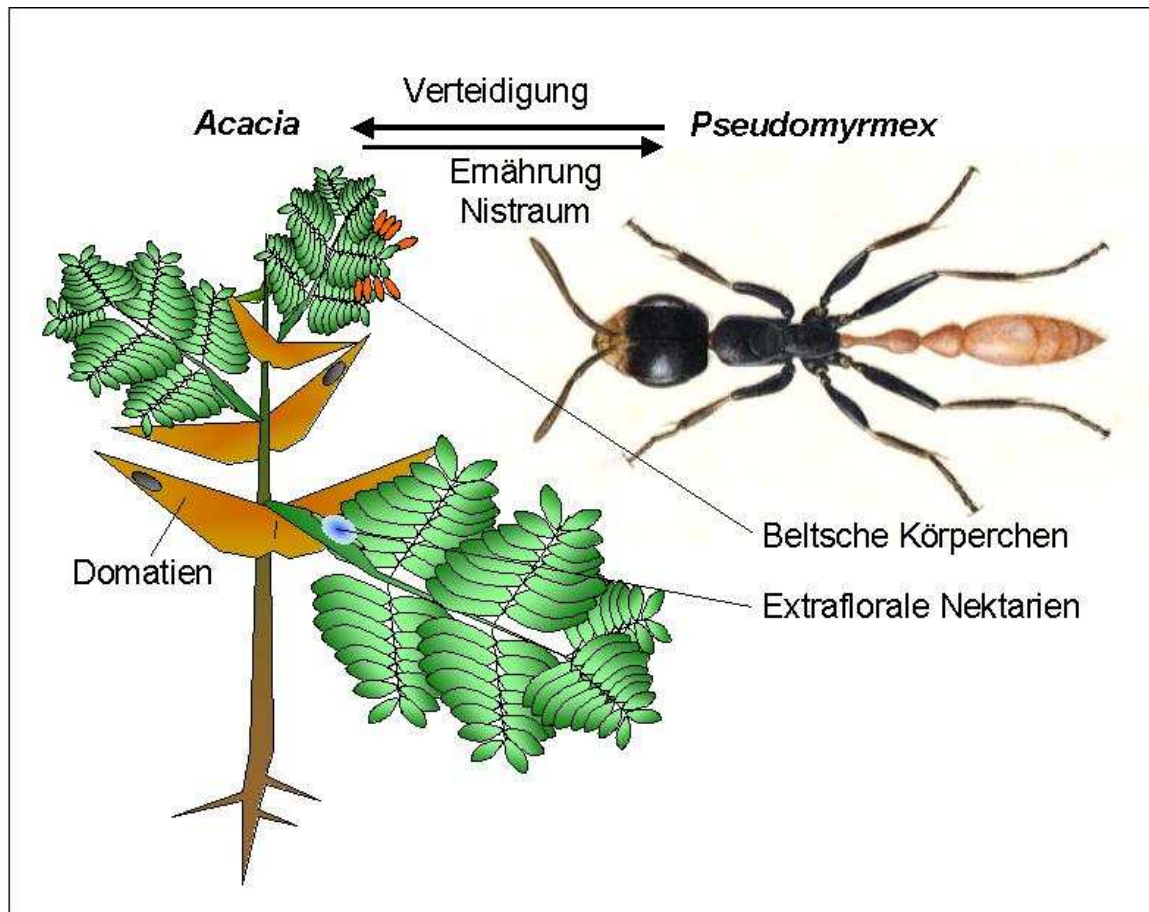
Die vorliegende Arbeit befasst sich insbesondere mit den schon frühzeitig beschriebenen myrmekophytischen Arten der Gattung *Acacia* aus dem Süden Mexikos und den damit assoziierten Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) (Belt 1874, Janzen 1966, Janzen 1967, Janzen 1974). Der Fokus lag dabei auf der obligaten mutualistischen Akazienameise *P. ferrugineus* (Smith, 1877), der nah verwandten, aber nicht mit Ameisenpflanzen assoziierten *P. salvini* (Forel, 1899) und der auf *Acacia* fakultativ parasitischen *P. gracilis* (Fabricius, 1804), die zwar die Akazien besiedelt und die Futterressourcen nutzt, die Pflanze jedoch nicht gegen Fraßfeinde verteidigt (Clement *et al.* 2008).

## 1.5 Interaktionen von Ameisen und Bakterien

Bislang sind erst wenige Symbiosen zwischen Ameisen und Bakterien eingehender untersucht worden. Hierbei handelt es sich meist um sehr spezielle Fälle, wie etwa den intrazellularen Symbionten *Wolbachia* (Wenseleers *et al.* 2002, Van Borm *et al.* 2001, Wenseleers und Billen 2000, Wenseleers *et al.* 1998), den intrazellularen Symbionten *Blochmannia* bei *Camponotus* (Roßameisen) (Blochmann 1892, Sauer *et al.* 2000, Sauer *et al.* 2002) und die Ektosymbiose von Actinomyceten mit Pilz kultivierenden neotropischen Ameisen (Attini) (Boursaux-Eude und Gross 2000, Currie *et al.* 1999). Das Verhältnis von

*Blochmannia* (Enterobacteriaceae) zum Wirt (Ameisen der Gattung *Camponotus* und nahe verwandte Gattungen) konnte mittlerweile in vielen Punkten aufgeklärt werden. Das Bakterium scheint dem Wirt vornehmlich als Stickstoff-Recycler und als Produzent essenzieller Aminosäuren zu dienen (Feldhaar *et al.* 2007, Gaudermann *et al.* 2006, Zientz *et al.* 2006). Wie Genomanalysen zeigten, hat das Bakterium seinerseits die Fähigkeit eingeübt, viele (für Tiere) nicht-essenzielle Aminosäuren zu produzieren und ist bezüglich auf die Versorgung mit diesen auf den Wirt angewiesen. Dementsprechend sind *Blochmannia* und *Wolbachia* nicht mehr in der Lage, außerhalb einer Wirtszelle zu leben oder sich zu reproduzieren (Zientz *et al.* 2005, Zientz *et al.* 2004). Auf großes Interesse stößt auch der Mutualismus zwischen Pilz züchtenden Ameisen (Attini) und ektosymbiotischen Actinomyceten (Cafaro und Currie 2005). Da die Ameisen eine Pilz-Monokultur (Lepiotaceae) kultivieren, sind sie gegenüber Schädlingen besonders empfindlich (Currie *et al.* 1999). Einen solchen Schädling stellt der Schimmelpilz *Escovopsis* dar, der die Pilzgärten der Ameisen überwuchern und damit zum Absterben des Pilzes führen kann (Poulsen *et al.* 2002, Currie 2001a, Currie 2001b, Currie *et al.* 1999). Unlängst konnten mit den Ameisen assoziierte Bakterien und andere Mikroorganismen (Hefen) identifiziert werden, die Antimikrobia freisetzen und dadurch das Auftreten pathogener Mikroorganismen unterbinden (Little und Currie 2008, Little und Currie 2007, Zhang *et al.* 2007, Currie *et al.* 1999). Diese Mikroorganismen tragen somit einen wesentlichen Anteil an der Stabilisierung des Mutualismus zwischen Ameise und Pilz bei.

Darmbakterien wurden bei Ameisen bislang nur in wenigen Stichproben untersucht. Zur Schwestergattung von *Pseudomyrmex*, der altweltlichen Ameisengattung *Tetraponera*, zu der ebenfalls Akazien bewohnende Arten zählen (Young *et al.* 1997), liegen einige Arbeiten vor (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b).



**Abbildung 1.1: Modellvorstellung des Ameise-Pflanze-Mutualismus**

Die Ameisenpflanze (hier das Beispiel *Acacia* sp.) bietet den Ameisen Wohnraum (Domatium = hohle Stipulardornen) und Futter in Form von EFN (extrafloraler Nektar an Nektardrüsen des Blattstiels) und lipid- sowie proteinreiche Futterkörperchen (Belt'sche Körperchen). Die Ameisen verteidigen im Gegenzug „ihre“ Ameisenpflanze gegen Fraßfeinde. Die Gattung *Pseudomyrmex* ist mit einem Giftstachel bewehrt und kann sogar große herbivore Säugetiere in die Flucht schlagen.

---

## 1.6 Umweltbakterien“ – Diversität, Artbegriff, Bedeutung

Prokaryoten wie Bakterien und Archaeen sind die Wegbereiter des Lebens auf der Erde (Brown *et al.* 2001, Horiike *et al.* 2001, Forterre und Philippe 1999, Vargas *et al.* 1998, Forterre 1995). In der rezenten Biosphäre nehmen Prokaryoten aufgrund ihrer biochemischen Mannigfaltigkeit und Kapazität Schlüsselrollen in allen wichtigen Stoffkreisläufen ein (Staley 2002). Dennoch werden sie erst seit wenigen Jahrzehnten als essenzieller Bestandteil aller Ökosysteme erforscht, was vor allem auf voranschreitende technologische Möglichkeiten zurück zu führen ist.



Unter den bislang intensiv untersuchten Bakterien nehmen die pathogenen Keime aufgrund ihrer unmittelbaren Relevanz für den Menschen eine dominierende Stellung ein. Wissenschaftlich beschrieben sind nach Lecomte und Guyader (2001) 9021 „Arten“ Eubakterien und 259 Archaeen. Tatsächlich dürfte die Diversität der Prokaryoten jedoch erheblich größer sein, wie Daten aus der Bodenmikrobiologie verdeutlichen: Nach Chatzinotas *et al.* (1998) und Torsvik *et al.* (1990) können pro Gramm Boden über  $10^{10}$  Zellen von  $10^4$  „Arten“ (besser Ribotypen, siehe unten) „Umweltbakterien“ existieren. Nach Curtis *et al.* (2002) und Dykhuizen (1998) kann mit einer Diversität von  $4 \times 10^6$  Taxa pro t Boden gerechnet werden, wobei die Gesamtdiversität der Eubakterien weltweit zwischen  $10^7$  bis  $10^9$  Taxa liegen soll. Insbesondere jenen Bakterien, die mit anderen Lebewesen wie Pilzen, Pflanzen oder Tieren eng assoziiert sind, kommt eine große ökologische Bedeutung zu, da viele Wirtsorganismen ohne sie nur schwer oder gar nicht lebensfähig wären. Erst kürzlich konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die menschliche Darmflora sehr viel diverser ist, als bislang vermutet wurde (Frank *et al.* 2007, Turnbaugh *et al.* 2007, Xu *et al.* 2007). Die Bedeutung dieser unerwarteten Diversität liegt noch im Dunkeln.

Den Begriff Art – Biospezies (Mayr 1942) – auf Bakterien anzuwenden, ist problematisch, da sich Bakterien primär durch Zellteilung vermehren und somit asexuell verhalten. Der Biospezies-Begriff nach Mayr (1942) ist aber auf sich nur klonal vermehrende Organismen nicht anwendbar (Kunz 2002a, Kunz 2002b). Darüber hinaus sind Prokaryoten zum Austausch genetischer Information über z. T. erhebliche systematische Grenzen hinweg und vielfach auch zur Aufnahme von DNA aus der Umwelt in der Lage. Damit sprengen Bakterien den klassischen Artbegriff. Statt den Begriff Art zu verwenden spricht man bei Prokaryoten daher im zunehmenden Maße von Ribotypen. Seit den 1980er Jahren dient als Konsens vornehmlich die Sequenzuntersuchung des 16S rRNA-Gens als Maßstab für die Erstellung eines taxonomischen Systems der Prokaryoten und die taxonomische Eingliederung (Woese 1987). Als „Artgrenze“ wurde später der DNA-DNA-Reassoziationspunkt bei 70 % festgelegt (Stackebrandt und Goebel 1994), der meist einer Sequenzübereinstimmung des 16S ribosomalen RNA-Gens (16S rRNA) von 97,5 % entspricht. Bei einem 16S rRNA-Sequenzunterschied von weniger als 2,5 % werden prokaryotische Isolate daher zu einem Ribotyp (von Ribosom) gezählt. Damit ist der „Art“-Begriff bei Prokaryoten viel weiter gefaßt als bei Eukaryoten. Mensch und Menschenaffen würden bei z. B. Anwendung der für Bakterien üblichen Definition zu einer Spezies gerechnet werden. In der vorliegenden Arbeit beschränke ich mich überwiegend auf höhere

taxonomische Ebenen (besonders Gattung), da eine genaue Auflösung mit der vornehmlich verwendeten molekularbiologischen Methoden nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Siehe dazu Abschnitt 3.4.

### 1.7 Experimentelle Grundlagen

Es wurden mehrere unterschiedliche Methoden angewandt und deren Ergebnisse verglichen: Die Gesamt-DNA konnte mit Hilfe handelsüblicher *Kits* aus den Proben (Ameisen und Larven) aufgereinigt bzw. isoliert werden (siehe hierzu Material und Methoden). Diese DNA stand dann für zwei Methoden zur Verfügung: Zunächst wurden über eine PCR definierte Zielgene amplifiziert (16S rDNA und *nifH*). Mit diesen - in geeignete Vektoren eingebauten - PCR-Produkten konnten anschließend kompetente *E. coli*-Stämme transformiert und das gewünschte Produkt in ihnen kloniert werden. Die Plasmide konnten isoliert und dann sequenziert werden. Zweitens wurden lebende Bakterien isoliert und in Kulturen vermehrt, um von diesen Isolaten dann, wie oben erläutert, die gesuchten Gene zu amplifizieren und zu sequenzieren. Da sich jedoch nur sehr wenige Bakterien mit den bislang zur Verfügung stehenden Techniken und Nährmedien kultivieren lassen, kann auf diese Weise nur ein sehr kleiner Ausschnitt der Bakterien erfaßt werden.

Zur Anwendung kam hauptsächlich eine tRFLP-Methode (terminaler Restriktionsfragmente-Längen-Polymorphismus) unter Verwendung des Programms TReFID (Rösch und Bothe 2005). Mit dieser Methode ist es möglich einen sehr großen Ausschnitt der Bakterienflora eines beliebigen Biotops zu identifizieren. Mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markierte Primer wurden für eine PCR mit den jeweiligen DNA-Proben verwendet, worauf für jede Probe ein Verdau mit bis zu 13 verschiedenen Restriktionsenzymen erfolgte. Die Länge des terminalen Restriktionsfragments (= tRF) mit dem markierten Primer hängt hierbei davon ab, in welchem Sequenzabschnitt nach dem Primer die erste Restriktionsstelle für das jeweils verwendete Restriktionsenzym auftritt. Da sich das 16S rRNA-Gen der verschiedenen Bakterienribotypen voneinander unterscheidet, kann angenommen werden, dass unterschiedliche Restriktionsschnittstellen (häufig kurze Palindrome) vorliegen. Beim Auftrennen im Gel oder Kapillarsequenzierer werden also diese markierten, terminalen Restriktionsfragmente detektiert, deren Länge anhand eines ebenfalls aufgetragenen Standards mit einem Computerprogramm innerhalb eines Bereichs von 500 bp nach dem Primer bis auf eine Base genau bestimmt werden kann. Bekannte Sequenzen vieler verschiedener Bakterien

in Datenbanken konnten auf ihre Restriktionsstellen hin abgesucht werden, wodurch die theoretische Länge des Restriktionsfragmentes prognostiziert werden kann, welches sich bei einer bestimmten Bakterienart unter Verwendung eines bestimmten Restriktionsenzym ergeben sollte. Mit Hilfe dieser „Schablonen“ konnten die in den Proben auftretenden Fragmentmuster den Datenbankeinträgen zugeordnet werden. Um eine gewisse Sicherheit bei der Bestimmung bis auf Gattungsniveau zu erlangen, werden 13 Restriktionsenzyme in separaten Restriktionsverdauansätzen verwendet, deren Eignung empirisch und unter Berücksichtigung der bekannten Sequenzen eingeschätzt werden kann. Das Programm TReFID vergleicht die Größen aller auftretenden Fragmente mit der Datenbank und erstellt eine Ergebnistabelle, in der die identifizierten Bakteriengruppen und Trefferwerte (Wahrscheinlichkeiten) aufgeführt werden, die eine Beurteilung der Qualität der Identifikation erlauben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probennahme und Handhabung

Die Probenahme erfolgte kontinuierlich von August bis einschließlich Oktober 2007 im Bundesstaat Oaxaca (Mexico). Die meisten Proben stammten aus der Umgebung der Stadt Puerto Escondido. Besammelt wurden *Pseudomyrmex ferrugineus* (Smith, 1877), *P. gracilis* (Fabricius, 1804) und *P. salvini* (Forel, 1899). *P. salvini* wurde am Rande der Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Estación de Biología Tropical de la UNAM; Volcáno San Martin; Universidad Nacional Autónoma de México), Bundesstaat Veracruz, gesammelt. Siehe hierzu den Anhang (Eilmus 2008). Bis auf *Acacia chiapensis* wurden alle Pflanzenproben in der Umgebung von Puerto Escondido gesammelt. Eine Tabelle mit den GPS-Koordinaten befindet sich im Anhang unter 7.1.

---



**Abbildung 2.1: Lage der Probenahmestellen in Mexiko.**

Ameisen- und Pflanzenproben wurden hauptsächlich in Puerto Escondido gesammelt. Abbildung: ©Stefanie Kautz.

### 2.1.1 Blätter und Nektarien

Es wurden ganze Fiederblätter einschließlich der Rachis und den darauf befindlichen extrafloralen Nektarien mit Ethanol-desinfizierten Handschuhen gesammelt und in ebenfalls desinfizierten Behältnissen gelagert. Sofern die Aufarbeitung der Proben nicht unmittelbar erfolgte, wurden die Proben bei 4 °C gelagert bzw. transportiert. Besammelte Pflanzenarten waren: *Acacia chiapensis* (Saff., J. Wash., 1915), *A. cochliacantha* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.), *A. collinsii* (Saff., 1910), *A. cornigera* (L., Willd., 1806), *A. farnesiana* (L., Willd.), *A. hindsii* (Benth, 1842), *A. macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd., 1810).

### 2.1.2 Wurzelknöllchen

Wie viele Leguminosen besitzen auch Akazien Wurzelknöllchen. Dabei handelt es sich um mit Knöllchenbakterien (Rhizobiales) infizierte und modifizierte Wurzelabschnitte (Toledo *et al.* 2003, Lloret *et al.* 2007). Meist handelt es sich bei dieser Interaktion von Pflanze und Bakterium um einen Mutualismus, bei dem speziell umgewandelte Bakterienzellen (Bakteroide) atmosphärischen Stickstoff (N<sub>2</sub>) in organischer Form fixieren und der Pflanze verfügbar machen (West *et al.* 2002). Im Gegenzug können sich die Bakterien im Intrazellularraum vermehren und werden durch die Pflanze mit organischen Säuren versorgt (Fritsche 1999).

Die Freilegung der Wurzelknöllchen an den Pflanzenwurzeln erfolgte mit einem Spaten, wobei in vielen Fällen nur an dicht unter der Erdoberfläche wachsenden Ausläufern gebildete Adventivwurzeln beprobt werden konnten. Die Knöllchen wurden mit Ethanol-desinfizierten Handschuhen gesammelt und in ebenfalls desinfizierten Behältnissen gelagert. Sofern die Aufarbeitung der Proben nicht unmittelbar erfolgte, wurden die Proben bei 4 °C gelagert bzw. transportiert. Besammelte Pflanzenarten: *Acacia chiapensis*, *A. cochliacantha*, *A. collinsii*, *A. cornigera*, *A. farnesiana*, *A. hindsii*, *A. macracantha*. Zusätzlich wurden die Knöllchenbakterien von *Phaseolus lunatus* von den Standorten Puerto Escondido und Matias Romero isoliert.

### 2.1.3 Ameisen und deren Larven

Ameisen und Larven wurden stets mit samt ihren Domatien (Akazienameisen) oder im Falle der nicht mit Akazien assoziiert lebenden *Pseudomyrmex*-Arten mit dem bewohnten hohlen Ästchen (*P. salvini*) gesammelt. Das Aufsammeln geschah dabei mit unmittelbar zuvor ethanoldesinfizierten Latexhandschuhen. Die Kunststoffbehältnisse zum Transport der Ameisenproben wurden ebenfalls mit 70 %igem Ethanol ausgewaschen. Die Dosen wurden beschriftet, Informationen zur Wirtspflanze und zum genauen Fundort mittels GPS-

Empfänger notiert. Besammelt wurden *P. ferrugineus* (Smith, 1877), *P. gracilis* (Fabricius, 1804) und *P. salvini* (Forel, 1899). Siehe hierzu den Anhang (Eilmus 2008).

#### **2.1.4 Kultivierung der Ameisen unter Laborbedingungen**

Siehe hierzu den Anhang: *Pseudomyrmex salvini* (Eilmus 2008)

#### **2.1.5 Präparation des Ameisendarmtraktes**

Die in einer Petrischale in sterilem Insektenringer befindlichen Ameisenlarven im dritten Larvenstadium konnten mit zwei Pinzetten vorsichtig aufgerissen werden. Dadurch lag der dunkle Darmkanal frei, der mit einer Pinzette in ein Eppendorfgefäß mit PBS (siehe Anhang 7.2) zur weiteren Verarbeitung überführt werden konnte.

#### **2.1.6 Probenaufarbeitung zur Bestimmung der Anzahl CFU**

CFU (colony forming units) werden all diejenigen Einheiten/Mikroorganismen genannt, die auf einem bestimmten Nährboden wachsen, also Kolonien bilden. Eine Probe (z. B. Darm einer Ameisenlarve) wurde abgewogen und mit 1,5 mL Bisphosphat-PBS (siehe Anhang 7.2) aufgeschwemmt. Die Suspensionen wurden anschließend bei Raumtemperatur für 45 min geschüttelt. Darauf folgte das Abzentrifugieren der größeren Partikel bei 20 g für 15 min. Die Überstände wurden abgenommen und bei 2500 g abzentifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpelett in 1 mL PBS-Puffer (siehe Anhang 7.2) resuspendiert. Es folgte ein nochmaliges Abzentrifugieren bei 2500 g. Das verbleibende Pellet wurde in 1 mL PBS-Puffer (= Bakteriensuspension) resuspendiert und konnte nun zum Ausstreichen (KB o. ä.) bzw. für die Verdünnungsreihen verwendet werden. Die Berechnung der CFU-Werte konnte dann folgendermaßen durchgeführt werden:

$$\text{CFU} = \text{Summe der Kolonien pro Platte} \times \text{Verdünnungsfaktor (1:10 bis 1:10.000)} \times 20.$$

Es wurde stets nur 50 µL von 1 mL (1:10) Bakteriensuspension auf den Nährmediumsplatten (siehe Abschnitt 2.2) ausgestrichen.

### **2.2 Isolierungs- und Kultivierungsverfahren für Bakterien**

#### **2.2.1 Isolierung der Gesamtheit von Mikroorganismen aus Blattproben**

1) 1 bis 2 g Blattmaterial wurde in einen sterilisierten Mörser unter Zugabe von ca. 5 mL Bisphosphat-PBS (siehe Anhang 7.2) bei Raumtemperatur so lange zerrieben bis eine homogene Masse entstand.

- 2) Von der Suspension konnten nun mehrere (5 x) 1,5 mL fassende Eppendorfgläser mit jeweils 1 mL gefüllt 30 s gevortext werden. Diese Blattaufschwemmung wurde nun ca. eine Stunde unter gelegentlichem Vortexen bei 4 °C stehen gelassen.
- 3) Zentrifugation: 10 min bei 2500 g.
- 4) Waschen und Abzentrifugieren der Zellwände: Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL Bisphosphat-PBS aufgeschwemmt. Nach einer Inkubation von 10 min und mehrmaligen Vortexen wurde bei 20 g für 15 min abzentrifugiert und der bakterienhaltige Überstand vorsichtig abgenommen und in ein weiteres Eppendorfglas überführt. Das zurück bleibende Pellet wurde auf die gleiche Weise zwei weitere Male behandelt, um eine möglichst große Ausbeute an Prokaryoten zu erzielen (3 x 1 mL PBS).
- 5) Waschen: Die gesammelten Überstände (Zellsuspensionen) wurden anschließend bei 2000 g pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde zur Entfernung verbliebener Bisphosphat-PBS-Reste in 1 mL PBS-Puffer (siehe Anhang 7.2) resuspendingiert, abzentrifugiert (2000 g). Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male wiederholt.
- 6) Suspension: Die resultierende Zellsuspension wurde zum Animpfen der KB-Platten verwendet, kann aber auch bei 4 °C mehrere Tage gelagert werden.

### **Kulturmedium/Platten zur Kultivierung von Bakterien aus Blattmaterial**

#### **King's B broth (KB)**

10 g/L Glycerin

20 g/L Proteose-Peptone (= Peptone) aus Fleisch oder Milch-Casein)

1,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

14 g/L Agarose

- Einstellung auf pH 7,0.
- Autoklavieren oder längeres Aufkochen in der Mikrowelle oder Dampfdrucktopf.

Es wurde Cycloheximid mit einer Endkonzentration von 1 mg/mL eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.8)

- Platten gießen unter der sterilen Impfbank (UMAR, Universitätslabor in Puerto Escondido)
- Kulturdauer: 14 Tage
- Es ergab sich eine Berechnung der auf KB kultivierbaren CFU von  $5 \times 3 \times$  Verdünnungsfaktor (1, 10, 100, 1000)  $\times 10$  (oder 20)/g Blattmaterial ( $\times 2 \times 2$  empirisch)

- Zum Transport konnten einzelne Kolonien aus den Agarplatten ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt werden (Lagerung im Kühlschrank).

### **2.2.2 Isolierung der Gesamtheit von Bakterien aus Ameisen**

Die Isolierung der Gesamtheit der Bakterien aus den Ameisen zur Kultivierung erfolgte aus lebenden Ameisen, die für wenige Sekunden in einer 70 %igen Ethanollösung oberflächensterilisiert und anschließend sofort in autoklaviertem Reinstwasser gewaschen wurden. Anschließend wurden die Ameisen in einem 2 mL-Eppendorfgefäß unter 1 mL PBS-Puffer (siehe Anhang 7.2) vollständig zermörsert und über mehrere Minuten bei höchster Einstellung gevortext.

Die Lösung wurde anschließend 30 sec bei 250 g und Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Von diesem Überstand wurden Konzentrationsreihen (1:10; 1:100; 1:1.000 und 1: 10.000) in sterilem PBS erstellt. Jeweils 50 µL dieser Suspensionen wurden auf den verschiedenen Kulturplatten (Abschnitte 2.2.1 KB-Medium, 2.2.7 und 2.2.9) unter einer Reinbank ausgestrichen, mit Parafilm (Alcan Packaging, Neenah, USA) verschlossen und über einen Zeitraum von 14 Tagen bei Raumtemperatur kultiviert. Nach der CFU-Bestimmung (Abschnitt 2.2.1) wurden einzelne Kolonien auf neue Kulturplatten ausgestrichen und so vereinzelt.

### **2.2.3 LB-Medium für *Escherichia coli***

Dieses Vollmedium wurde als Standardmedium zur Kultivierung von *Escherichia coli* zum Selektieren, Klonieren und Anziehen in Flüssigkultur verwendet.

10 g NaCl

10 g Trypton (Roth, Karlsruhe)

5 g Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

ad 1000 mL H<sub>2</sub>O demineralisiert (demin.).

Für Platten wurden 14 g Agar-Agar pro Liter hinzugefügt. Das Medium kann auf Vorrat produziert und nach dem Autoklavieren in sterilen Flaschen bei Zimmertemperatur gelagert werden. Mehrmaliges Erhitzen zum Verflüssigen ist möglich (Bast 1999).

### **2.2.4 Medium für *Bradyrhizobium japonicum***

Die *B. japonicum*-Stammkultur USDA 110 wurde zur Eichung der *nifH*-PCR verwendet.

1 g Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

10 g Mannit

200 ml Bodenextrakt\*



ad 800 ml H<sub>2</sub>O demin.

Einstellen auf pH 7,0

\*) Bodenextrakt: 80 g getrockneter, ungedüngter Boden; 0,2 g Natriumcarbonat; 200 mL Wasser demin. Boden, Natriumcarbonat und Wasser gut aufschütteln und 1 Stunde autoklavieren. Den Überstand abnehmen und kurz abzentrifugieren.

### **2.2.5 Medium für *Pseudomonas syringae***

20 g Glucose

10 g Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

2 g CaCO<sub>3</sub>

auf 1 L H<sub>2</sub>O demin.

Für Platten wurden 14 g Agar-Agar pro Liter hinzugefügt. Das Medium kann auf Vorrat produziert und nach dem Autoklavieren in sterilen Flaschen bei Zimmertemperatur gelagert werden.

### **2.2.6 Medium für *Saccharomyces cerevisiae***

Hefe-Kultur nach 186 DMSZ

3 g Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

3 g Malz-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

5 g Trypton (Roth, Karlsruhe)

10 g Glucose

Das Gemisch auf 1 L mit destilliertem Wasser auffüllen.

Kulturbedingungen im Brutschrank bei 30 °C. Für Platten wurden 14 g Agar-Agar pro Liter hinzugefügt. Das Medium kann auf Vorrat produziert und nach dem Autoklavieren in sterilen Flaschen bei Zimmertemperatur gelagert werden.

### **2.2.7 YEM-Medium für Anreicherungskulturen**

Dieses Spezialmedium kam bei der Anzucht von heterotrophen Bakterien zur Anwendung. Eine geringfügig verbesserte Form dieses Kulturmediums stellt das Medium, vorgestellt unter 2.2.7, dar.

10 g Mannit

400 mg Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

500 mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

200 mg MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

100 mg NaCl

ad 1000 mL H<sub>2</sub>O demin. Der pH-Wert wurde mit HCl (2M) auf 7,0 eingestellt.

### **2.2.8 YEM+-Medium**

Von dem unter 2.2.5 beschriebenen Medium unterscheidet sich dieses Kulturmedium durch die Zugabe von Glucose, Bacto-Trypton und einer Spurenelementlösung (beschrieben unter 2.2.12). Durch einen Mangel an bestimmten Spurenelementen könnten eventuell verschiedene Bakterien nicht auf den Nährböden wachsen. Durch einen Zusatz an Spurenelementen kann die Zahl anwachsender Kolonien erhöht werden. Zudem konnte es wahrscheinlich durch Speicherung von Spurenelementen zu Verfärbungen einzelner Kolonien kommen, was eine Unterscheidung der Stämme erleichterte.

8 g Mannit

2 g Glucose

400 mg Bacto-Trypton (Roth, Karlsruhe)

400 mg Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

500 mg K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>

400 mg MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

100 mg NaCl

1 mL Spurenelement-Stammlösung (1:1.000)

Gelierzusatz: 14 g Agar-Agar oder 10 g Gellan (Gelrite; Roth, Karlsruhe) zuzüglich 1 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (absolut pro L). Der pH-Wert wurde mit HCl (2M) auf 7,0 eingestellt. Wurde Gellan als Gelierzusatz verwendet, konnte das Medium nach dem Autoklavieren und einmaligem Erstarren nur noch ein weiteres Mal verflüssigt werden. Bei mehrfachem Erstarren und Verflüssigen wurde das Medium klumpig und konnte für den Plattenguss nicht mehr verwendet werden. Ein Gießen von Gellan-Platten auf Vorrat und Lagerung der Platten im Kühlschrank war aber wegen der guten Wasserspeicherung möglich.

Cycloheximid wurde den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt, um das Wachstum von eukaryotischen Mikroorganismen (Pilze, Protozoen) zu inhibieren. Cycloheximid-Stammlösung 1g/10 mL (100 mg/1mL) wurde folgendermaßen eingesetzt: 100 µL auf 100 mL bis 1000 mL Nährmedium (0,1 bis 0,01 mg/mL).

### **2.2.9 Modifiziertes YEM+ -Medium für Ameisendarmflora**

Medium zur CFU-Bestimmung. Unterschiedliche C-Quellen (siehe Tabelle unten).

400 mg Trypton (Roth, Karlsruhe)

400 mg Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

500 mg K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>

400 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

100 mg NaCl

1 mL Spurenelement-Stammlösung (1:1000) (siehe 2.2.12)

Einstellung auf pH 7,0.

Cycloheximid-Zugabe wie unter 2.2.8 beschrieben.

C-Quellen: Die verschiedenen Kohlenhydrate sind nach Bedürfnissen der Bakterien (Mannit für Rhizobien) und nach Substratverhältnissen (EFN: Saccharose, Glucose und Fructose) ausgerichtet.

M	Ameisendarm Bodenprobe	10 g Mannit
S	Ameisendarm I	10 g Saccharose
GF	Ameisendarm IV	5 g Glucose 5 g Fructose

### 2.2.10 Modifiziertes YEM+ -Medium für Rhizobien (nach DSMZ)

Kulturbedingung: aerob, 28 °C

10 g Mannit

200 mL Bodenextrakt

1 g Hefe-Extrakt (AppliChem, Darmstadt)

500 mg  $\text{K}_2 \text{ HPO}_4$

400 mg  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

100 mg NaCl

1 mL Spurenelement-Stammlösung (1:1.000) (siehe 2.2.12)

Einstellung auf pH 7,0

Für Platten wurden 14 g Agar-Agar pro Liter hinzugefügt. Das Medium kann auf Vorrat produziert und nach dem Autoklavieren in sterilen Flaschen bei Zimmertemperatur gelagert werden.

### 2.2.11 Stickstoffarmes Medium

Ein stickstoffarmes Spezialmedium diente der Anreicherung bzw. Anzucht Stickstoff fixierender Bakterien. Um ein Aufkommen photolithoautotropher Mikroorganismen zu verhindern, wurden die Kulturen dunkel gehalten.

10 g Mannit (oder Glucose, Saccharose)

0,04 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

0,04 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g  $\text{K}_2 \text{ HPO}_4$

1 mL Spurenelementlösung (Siehe 2.2.12)

Einstellung auf pH 7,0

Es wurden stets nur wenige mL auf die Erlenmeyerkolben verteilt, so dass eine große Flüssigkeitsoberfläche zum Gasaustausch zur Verfügung stand. Ebenso wurden Kulturen mit nur geringer Gasaustauschmöglichkeit angesetzt. (Zusatz von Cycloheximid: Siehe 2.2.8)

### **2.2.12 Spurenelementlösung**

Die Spurenelementlösung (Bast 1999) wurde verschiedenen Nährmedien für die Isolierung von Bodenbakterien zugefügt, um einen eventuell vorliegenden Mangel an bestimmten Spurenelementen vorzubeugen.

5,2 g EDTA

2,0 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

150 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$

100 mg  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$

62 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$

190 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

17 mg  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

24 mg  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

36 mg  $\text{Na}_2 \text{ MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

(alles auf einen Liter)

### **2.2.13 Anzucht von Bakterien in Flüssignährmedien**

Die Kultivierung der isolierten Bakterienstämme bzw. der Anreicherungskulturen erfolgte aerob in Schüttelkulturen (bei 300 rpm) bei 30 °C (Bodenbakterien) bzw. 37 °C (*E. coli*). Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Volumina von 5 bis 50 mL verwandt. Die Kulturdauer richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit und war durch eine deutliche milchige Eintrübung des Mediums ersichtlich. Im Falle der Rhizobien, die aus den Knöllchen der Akazien und der Limabohne isoliert wurden, wurden diese Kulturen unmittelbar bei Erreichen dieses Stadiums (milchige Eintrübung, exponentielles Wachstum) zum Animpfen der Wirtspflanzen genutzt.

### 2.2.14 Kultivierung von Bakterien auf Nährböden

Ein steriles Agarmedium wurde unter der Sterilbank in Petrischalen gegossen. Neben Agar-Agar kam auch Gellan als Geliermittel zum Einsatz. Nach dem Beimpfen wurden die Kulturschälchen je nach Bakterienart bei unterschiedlichen Temperaturen gezeitigt. Bei + 4 °C ließen sich die Kulturen so auch längere Zeit aufbewahren. Cycloheximid wurde, wie unter Abschnitt 2.2.8 beschrieben, eingesetzt, wenn aus verdünnten Umweltproben direkt Kulturen angelegt werden sollten, um Wachstum eukaryotischer Mikroorganismen zu inhibieren.

### 2.2.15 Gellan-Platten

Pro Liter Medium wurden 10 g Gellan und 1 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$  eingewogen. Die Vorteile dieses Plattengeliermittels gegenüber Agarose sind die relativ lange Haltbarkeit (es gibt nur langsam Wasser ab), die Transparenz (es ist farblos und dadurch eignet sich zur fotografischen Dokumentation der Kolonien) und die Tatsache, dass nur relativ wenige Mikroorganismen Gellan als Kohlenstoffquelle/Kohlenhydratquelle verwerten können (Bast 1999).

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Präparation für molekularbiologische Analysen der Bakterienflora

Die Extraktion der (mikrobiellen) Gesamt-DNA wurde mit unterschiedlichen Kits nach Protokoll der Hersteller durchgeführt: Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen Str. 1, Hilden), MoBio UltraClean™ microbial DNA Isolation Kit und MoBio UltraClean™ Soil DNA Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, USA).

### 2.3.2 PCR zur Amplifikation der Markergene aus Umwelt-DNA-Präparaten

Durch das Verfahren der PCR konnten selektiv mit Hilfe spezifischer Primerpaare Markergene amplifiziert werden, die in den Gesamt-DNA-Präparaten vorhanden waren.

Die durchgeführten PCR basieren auf folgendem Rezept für ein Gesamtvolumen von 50 µL:

	50 µL	25 µL	250 µL (Premix für 10 x 25µL Ansätze)
PCR-Puffer (Eppendorf; Hamburg)	5 µL	2,5 µL	25 µL
Taq-Master (Taq-M; Eppendorf)	20 µL	10 µL	100 µL
dNTPs (Eppendorf)	4 µL	2 µL	20 µL

Primer	jeweils 1 µL der Primer	0,5 µL	2,5 µL
DNA-Probe	1 µL	0,5 µL	2,5 µL
PCR-H <sub>2</sub> O (Millipore)	18 µL	9 µL	95 µL

Je nach Bedarf wurden 50 µL- oder nur 25 µL-Ansätze verwendet. Ein kleineres Volumen erwies sich oftmals als günstiger, da das Gemisch schneller erwärmt bzw. abgekühlt werden konnte. Die PCR wurden 1 (16S rRNA-Gen; 2.3.3) und 2 (für *nifH* und kurze 16S rRNA-Stücke 2.3.3) verwendet. Nach Schritt 1 des Programms wurde die *Taq*-Polymerase (weniger als 0,5 µL) zugefügt (*hot start*). Das Gerät wurde stets vorgeheizt (Deckel), um die Bildung von Kondenswasser zu verhindern. Verwendet wurde der *Primus 96 advanced Gradient Thermocycler* von Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen.

#### **Alternatives Protokoll der Klonierung der Insert-DNA des Vektor-Systems in *E. coli* zur Gewinnung von sequenzierfertigen DNA-Proben ohne Plasmidpräparation**

Die bei der Blau-Weiß-Selektion (Abschnitt 2.3.10) gepickten, transformierten *E. coli*-Klone wurden bei diesem Zeit und Material sparenden Protokoll nicht in LB angezogen und einer Plasmidpräparation unterzogen, sondern als Template für einen weiteren PCR-Schritt verwendet. Um das Insert des gewünschten Markergens im Plamid zu amplifizieren, wurde eine PCR mit den Primerpaaren Sp6 und T7 (siehe unten: greifen in der flankierenden Plasmidregion um das Insert an) oder die spezifischen Markergen-Primer (*nifH*) verwendet. Die PCR wurde nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend gefällt. Nach einer Kontrolle auf einem Agraosegel (Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Ausfällung ohne Verunreinigung) standen die Amplifikate zur Sequenzierung bereit.

Verwendete Primer:

„*nifH*-F“: 5'-AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC-3'

„*nifH*-R“: 5'-TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT-3'

K07-F: GCG TTC TAC GGT AAG GGC GGT ATC GGN AAR

AMR-R: GCT ACT ACY TCG CCS GA

16S: 27f/1495r (Weisburg *et al.* 1991)

„27f“: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

„1494r“: 5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'

16S: 63f/1387r (Marchesi *et al.* 1998)

„63f“: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'

„1387r“: 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'

„778r“: 5'-AGGGTATCTAATCCTGTTTGC-3'

Sequenzierungsprimer für das pGEM®-T Easy (Promega, Mannheim)

„Sp6“: 5'-TTTAGGTGACACTATAGAATA-3'

„T7“: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'

PCR-Programme für die verschiedenen Markergene

**Programm 1 („RNA CR“ für das 16S rRNA-Gen)**

Die einzelnen Schritte des Programms variierten in Temperatur und Länge, um möglichst viele unterschiedliche Amplifikate zu erhalten. Das Programm wurde speziell für die oben beschriebenen 16S rDNA-Primer modifiziert.

Vorheizen des Deckels auf 99 °C

96 °C für 4 min Denaturierung

85 °C für 1 sec Zugabe der Polymerase

1 Zyklus

94 °C für 20 sec Denaturierung

66 °C für 30 sec Annealing

72 °C für 30 sec Elongation

2 Zyklen

94 °C für 20 sec Denaturierung

64 °C für 30 sec Annealing

72 °C für 30 sec Elongation

3 Zyklen

94 °C für 20 sec Denaturierung

62 °C für 20 sec Annealing

72 °C für 40 sec Elongation

5 Zyklen

94 °C für 20 sec Denaturierung

60 °C für 30 sec Annealing

72 °C für 45 sec Elongation

29 Zyklen

94 °C für 30 sec Denaturierung  
56 °C für 40 sec Annealing  
72 °C für 1 min Elongation  
Abschluss  
72 °C für 10 min  
4 °C Pause/Ende des Programms

**Programm 2 ( *nifH* und kurze 16S rDNA-Fragmente bis 700 bp)**

Vorheizen des Deckels auf 110 °C  
94 °C für 4 min Denaturierung  
85 °C für 1 sec Zugabe der Polymerase  
1 Zyklus  
94 °C für 20 sec Denaturierung  
66 °C für 30 sec Annealing  
72 °C für 30 sec Elongation  
2 Zyklen  
94 °C für 20 sec Denaturierung  
64 °C für 30 sec Annealing  
72 °C für 30 sec Elongation  
3 Zyklen:  
94 °C für 20 sec Denaturierung  
62 °C für 30 sec Annealing  
72 °C für 35 sec Elongation  
6 Zyklen:  
94 °C für 20 sec Denaturierung  
60 °C für 30 sec Annealing  
72 °C für 40 sec Elongation  
28 Zyklen:  
94 °C für 20 sec Denaturierung  
56 °C für 30 sec Annealing  
72 °C für 40 sec Elongation  
Abschluss  
72 °C für 10 min  
4 °C Pause/Ende des Programms



### 2.3.3 PCR für t-RFLP-Ansätze

Dabei wurden am 5'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Primer verwendet. In diesem Fall kamen die Primer 63f-FAM (hergestellt von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zum Einsatz. Diese wurden jeweils mit nicht modifizierten dazu passenden Primern kombiniert: 778r und 63f. Da die Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, mussten die Ansätze bei der Arbeit so weit wie möglich vor Licht geschützt werden.

Rezeptur nach PeqLab

<b>PeqLab</b>	<b>50 µL</b>	<b>25 µL</b>	<b>250 µL (Premix; 10x)</b>
PCR-Puffer 10 x	5 µL	2,5 µL	25 µL
Enhancer 5 x	(10 µL)	(5 µL)	50 µL
Mg <sup>2+</sup> (25mM)	3 µL	1,5 µL	15 µL
dNTPs	4x 1 µL	4x 0,5 µL	4x 5 µL
Primer 50 nM/mL	jeweils 1 µL der Primer	2x 0,5 µL	2x 10,0 µL
DNA-Probe	1 µL	0,5 µL	1 µL
PCR-H <sub>2</sub> O (Millipore)	35 µL (25 µL)	17,5 µL (12,5 µL)	110 µL (130 µL)
Taq	0,2 µL	0,1 µL	1,0 µL

Das verwendete Programm war Nr. 1 (Abschnitt 2.3.3) des PCR-Automaten (Primus 96 advanced, Peqlab, Erlangen). Wie oben bereits beschrieben wurde die *Taq*-Polymerase nach dem ersten Schritt des Programms zugefügt. Die Ansätze wurden anschließend mit einem Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und nach der unter 2.3.9 beschriebenen Methode gereinigt/isoliert.

### 2.3.4 Restriktionsverdau der t-RFLP-Proben

Mischung pro Ansatz:

5 µL Puffer (enzymspezifisch nach Herstellerangaben; Fermentas GMBH, St. Leon-Rot )

10-50 µL DNA-Proben aus T-RFLP (abhängig von der DNA-Konzentration)

0,5 µL Enzym

Der Ansatz wird mit PCR-H<sub>2</sub>O bis zu einem Volumen von 50 µL aufgefüllt.

Folgende Enzyme wurden eingesetzt: *AluI*, *Bme1390I*, *Bsh1236I*, *BsuRI* (=HaeIII), *Cfr13I*, *Hin6I*, *HinfI*, *MboI*, *MspI*, *RsaI*, *TaiI*, *TaqI* und *TasI*. Die Ansätze mit den ersten 10 Restriktionsenzymen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diejenigen Ansätze mit den letzten 3 Enzymen (*TaiI*, *TaqI* und *TasI*) wurden über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die Enzyme wurden von der Firma Fermentas (MBI) GmbH, St. Leon-Rot bezogen. Die Fragmentanalyse

erfolgte mit einem Kapillarsequenzierer Modell ABI 3730 und wurde vom Unternehmen GENTERPRICE Genomics, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH (Mainz) durchgeführt. Die resultierenden Datensätze wurden wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben analysiert.

### **2.3.5 Wasser für PCR**

Um Verunreinigungen der PCR-Ansätze zu vermeiden, wurde stets nur hochreines PCR-Wasser verwendet. Es wurde wie folgt vorbereitet:

Wasser aus der Millipore-Aufbereitungsanlage wurde zunächst autoklaviert, mit einer sterilen Einweg-Spritze aufgezogen und anschließend durch eine Filtermembran „Acrodisc® Syringe Filters“ (25 mm; 0,2 µm) gedrückt und aliquotiert.

### **2.3.6 DNA-Fällung (für Plasmidaufarbeitung und PCR-Produktanreicherung)**

Grundsätzlich wurde die DNA aus wässrigen Lösungen nach folgender Methode gefällt und gereinigt: Der Probe wurde das 0,1-fache Volumen einer 3 molaren Kaliumacetatlösung (pH 4,8) zugesetzt, gut durchmischt und anschließend das 0,6-fache Volumen an Isopropanol hinzugefügt und ebenfalls gut geschüttelt. Die Mischung wurde zur Fällung mindestens ½ Stunde bei RT stehen gelassen und anschließend mindestens eine ¾ Stunde bei 18320 g abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend verworfen und auf das DNA-Pellet 100 – 200 µL 70 %iges Rotisol (Roth, Karlsruhe) gegeben („Waschen“) und für 5 min bei 18320 g zentrifugiert. Danach konnte die Flüssigkeit abgeschüttet werden und die Eppendorf-Gefäße mit den Pellets in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) bis zur völligen Trocknung zentrifugiert werden. Die trockenen Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt (Mühlhardt 1999). Für die Sequenzierung wurden die Proben mit 10 µL PCR-Wasser rehydriert. Die rehydrierten Proben können unmittelbar zur Sequenzierungs-PCR (durchgeführt von externem Dienstleister, Genterprice Genomics, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) eingesetzt werden. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Kapillarsequenzierer Modell ABI 3730 und wurde vom Unternehmen Genterprice Genomics, Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz durchgeführt.

### **2.3.7 Agarose-Gel zur Elektrophorese**

Es wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Gele (w/v) verwendet (abhängig von der Länge der Amplifikate: 2 %ige Gele für Amplifikate bis 700 bp, 1 %ige Gele für Amplifikate von über 1.000 bp). Dazu wurde der 1x TAE-Puffer (siehe Anhang: 7.2) mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht, anschließend bei ca. 50 bis 60 °C mit einer geringen

Menge (1 µL oder weniger) Ethidiumbromid (1 mg/mL; Roth, Karlsruhe) versetzt und in eine entsprechende Form (Gelträger) gegossen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt (Mühlhardt 1999).

### **2.3.8 Isolierung der DNA aus einem Agarose-Gel**

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem *Min Elute PCR Purification Kit 50* (Qiagen, Hilden) nach beiliegender Beschreibung. Alternativ wurde auch Ultra free-MC, Millipore: Centrifugal Filter Devices (Millipore, Schwalbach) verwendet. Die Gelstücke wurden in diesem Fall in den Filter eingeführt und laut Packungsbeilage bei 8.000 rpm für 5 min zentrifugiert.

Die erhaltenen DNA-Proben (im Puffer) wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **2.3.9 Klonbibliothek**

#### **2.3.9.1 Ligation der Amplifikate in einen Vektor**

Die Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase nach dem Protokoll des pGEM-T Easy Vektorsystems (Promega, Mannheim). Beim Vektor pGEM-T Easy handelt es sich um ein 3018 bp großes, linearisiertes Plasmid mit 3'-Thymidin-Überhang, das direkt zur Ligation und anschließender Klonierung von PCR-Produkten mit 3'-Adenosin-Überhang herangezogen werden kann. Der Vektor enthält unter anderem als Marker-Gen ein Ampicillinresistenzgen ( $Amp^r$ ) und das  $\beta$ -Galactosidasegen (*lacZ*) in dem sich die Insertionsstelle für das PCR-Produkt befindet. Es handelt sich also hierbei um das Verfahren der Insertionsinaktivierung: Durch die Insertion des PCR-Produktes verliert die entsprechende *E. coli*-Zelle die Fähigkeit, Galactosidase zu synthetisieren, was man sich bei der Blau-Weiß-Selektion zu nutze macht. Siehe dazu Abschnitt 2.3.10.5. Die Ansätze setzten sich aus 5 µL Ligationspuffer (2x), je 0,5 bis 1 µL Vektor (abhängig von der Menge des PCR-Produktes), 1 µL bis 3 µL PCR-Produkt (auf Gel vorab Menge bestimmt; zwischen 20 – 200 nmol PCR-Produkt) und 1 µL Ligase zusammen (so weit erforderlich mit PCR-Wasser auf Gesamtvolumen von 10 µL auffüllen). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht gemäß Händlerprotokoll.

#### **2.3.9.2 Herstellung und Anzucht kompetenter Zellen**

Zunächst wurden je zwei 300 mL fassende Erlenmeyerkolben mit 100 mL  $\Psi$ b-Medium befüllt und über Nacht bei 37 °C vorgewärmt. Parallel wurden 50 µL der Glycerinstammkultur DH5 $\alpha$  in 5 mL  $\Psi$ b-Medium (siehe Anhang: 7.2) über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler angezogen. Am darauf folgenden Tag wurde zunächst je 1 mL der Vorkulturen in 100 mL vorgewärmtes Medium geben und 2,5 h bei 37 °C geschüttelt. Die Kulturen wurden anschließend in 50 mL Kunststoffgefäße mit Schraubverschluß (Falcons) gefüllt und 15 min

auf Eis gestellt. Das Abzentrifugieren erfolgte 10 min lang bei 2000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum durchgeführt: Das Zellpellet wurde in 1 mL Tfb1 (siehe Anhang: 7.2) resuspendiert und dann mit Tfb1 auf 15 mL aufgefüllt. Diese Ansätze mussten weitere zwei Stunden auf Eis inkubieren. Es folgte ein erneutes Abzentrifugieren bei 2000 rpm und 4 °C über 5 min. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 2 mL Tfb2 (siehe Anhang 7.2) resuspendiert. Mit abgeschnittenen Eppendorf-Pipettenspitzen wurden die Zellsuspensionen zu je 100 µL aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.3.9.3 Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen**

Zur Transformation wurde der kompetente *E. coli*-Stamm XL1 Blue (DSMZ, Braunschweig) verwendet, der nach einer modifizierten Methode des *heat shock* leicht transformiert werden kann. Jeweils 100 µL kompetenter *E. coli* XL1 Blue wurden auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz (Abschnitt 2.3.9.1) zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 3 min auf 42 °C erhitzt und danach 900 µL LB-Medium (Abschnitt 2.2.3) dazugegeben. Nach 30 bis 90 min Inkubation wurden diesen Ansätzen 100 µL entnommen und auf Selektionsplatten (folgender Abschnitt) ausgestrichen. Der Rest wurde bei 2500 g pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in der zurück bleibenden Flüssigkeit erneut resuspendiert. Diese nun deutlich höher konzentrierten Ansätze wurden ebenfalls auf den Selektionsplatten ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37 °C kultiviert (Bast 1999).

### **2.3.9.4 Selektionsplatten für transformierte *E. coli***

Hierfür wurde dem auf 60 °C abgekühlten Agarmedium (LB, 2.2.3) das Antibiotikum Ampicillin hinzugefügt (1:1.000; Siehe Anhang 7.2). Die Wahl des Antibiotikums richtet sich nach der Wahl des genutzten Transformationsvektors. In diesem Fall wurde das Vektorsystem pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) verwendet, das ein Ampicillinresistenzgen enthält (Siehe Abschnitt 2.3.9.1). Für die Blau-Weiß-Selektion der transformierten *E. coli*-Stämme wurde dem Medium 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal) und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosyl-pyranosid (IPTG) in den Endkonzentrationen von je 32 mg/L (oder X-Gal 1:1.000 und IPTG 1:5.000) zugesetzt (Siehe Anhang 7.2).

### **2.3.9.5 Blau-Weiß-Selektion**

Von den sich auf den Selektionsplatten (Abschnitt 2.3.9.4) entwickelnden Kolonien verfärben sich diejenigen Kolonien blau (Spaltung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -d-galactosid durch  $\beta$ -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff; IPTG induziert hierbei die Genexpression

des  $\beta$ -Galactosidase-Gens), deren *lacZ*-Gen durch die Insertion mit einem PCR-Produkt nicht inaktiviert wird (Insertionsinaktivierung). Kolonien, die weiß bleiben, weisen (mit großer Wahrscheinlichkeit) einen Vektor auf, der auch das interessierende PCR-Produkt enthält. Solche Kolonien (Klone) wurden in flüssiges 5 mL LB-Medium überführt und bis zu einer hinreichenden optischen Dichte (37 °C; Schüttler; über Nacht) kultiviert.

#### **2.3.9.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Hierbei kam das Verfahren der alkalischen Lysis zum Einsatz. Es wurden 2 mL der *E.coli*-Kultur abgenommen und in 2 mL-Eppendorf-Gefäße überführt. Diese wurden 10 min lang bei 18320 g ( $\approx$  15300 rpm) abzentrifugiert (Sigma 2K15). Der Überstand wurde dekantiert und das im Eppendorfgefäß zurück bleibende Pellet in 100  $\mu$ L BD I-Lösung (Siehe Anhang 7.2) resuspendiert. Anschließend wurden zunächst 200  $\mu$ L BD II und - nach mischen (Vortex für 5 sec) - 150  $\mu$ L BD III hinzugegeben und nochmals die Lösung kräftig gemischt (Vortex für 5 sec). Sogleich entstand ein deutlicher weißer Niederschlag (Kaliumdodecylsulfat und Zellbestandteile). Das Gemisch wurde abermals 10 min bei 18320 g abzentrifugiert. Von der klaren Flüssigkeit (ohne weiße Flocken: Proteine, genomische DNA, SDS und andere Verunreinigungen) wurden 450 bis 500  $\mu$ L in ein neues 1,5 mL-Eppendorfgefäß gegeben und mit den 0,6-fachen des Volumens an Isopropanol aufgefüllt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Die Proben wurden erneut für 30 min bei 18320 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet 200  $\mu$ L 70 %iges Rotisol gegeben, erneut 10 min bei 18320 g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. In der Vakuumzentrifuge (SpeedVac) wurden die Proben nun gut 10 min getrocknet. Das zurück bleibende Plasmid-DNA-Pellet wurde nun in 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (autoklaviertes Wasser, reinfiltrierte, 30 min stehen lassen) aufgenommen. Die derartig präparierte Plasmid-DNA stand nun für die weiteren Arbeitsschritte zur Verfügung. Bei -20 °C war die DNA dauerhaft haltbar (Mühlhardt 1999).

#### **2.3.9.7 RNase-Verdau zur Reinigung der Plasmidpräparate von RNA**

Vor dem Sequenzieren mussten die Plasmidpräparate einem RNase-Verdau unterzogen werden, um Rückstände der *E. coli*-RNA zu entfernen, da RNA-Spuren zum Misslingen der Sequenzierungs-PCR führen können.

Von der 30  $\mu$ L messenden Plasmid-Aufbereitung (vorheriger Abschnitt) wurden 1,5  $\mu$ L für den *EcoRI* -Verdau (folgender Abschnitt) abgenommen. Die verbleibenden 28,5  $\mu$ L wurden mit 3  $\mu$ L RNase (10x; vorher 10 min bei 100°C denaturieren und langsam abkühlen lassen) versetzt und für 1 ½ Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wie folgt behandelt: Die ca. 30  $\mu$ L messenden Ansätze wurden mit 470  $\mu$ L Wasser auf 500  $\mu$ L aufgefüllt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter dem Abzug. Nach Zugabe von 500  $\mu$ L

Phenol wurde kurz kräftig geschüttelt (Vortex für 5 sec) und für 10 min bei 18320 g zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Anschließend konnte die obere wässrige Phase abgenommen werden und in neue 1,5 mL-Eppendorf-Gefäße überführt werden. Die untere phenolische Phase wurde verworfen. Zum Überstand wurden 500 µL Chloroform gegeben, kräftig durchmischt (Vortex für 5 sec) und erneut bei 18320 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wiederum abgenommen und die untere Phase aus Chloroform verworfen. Zum Fällern der DNA wurden der Probe 50 µL BD III-Lösung zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden 330 µL Isopropanol zugefügt, nochmals gut durchmischt und mindestens 30 min bei RT stehen gelassen (oder bei -20 °C über Nacht). Letzte Schritte vor der Sequenzierung: Siehe Abschnitt 2.3.7 DNA-Fällung.

### **2.3.9.8 EcoRI-Restriktion der Plasmide**

Durch den *EcoRI*-Verdau konnten solche Plasmide identifiziert werden, die keine Insertion mit dem gewünschten Amplifikat aufwiesen. Dafür wurden nach der alkalischen Lyse die Plasmidproben auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch das Restriktionsenzym wurden die Insertionen aus dem Plasmid herausgeschnitten. Die Auftrennung bei der Gelelektrophorese zeigte dann neben einer deutlichen Bande (Plasmid) eine kleinere Bande (Insertion des Amplifikates). War dieses Stück nicht vorhanden, oder entsprach nicht der erwarteten Größe, wurden diese Plasmide nicht sequenziert. Für den Verdau wurde ein Gesamtvolumen von 15 µL entsprechend dem Volumen in den Geltaschen des Agarosegels angestrebt.

1,5 µL *EcoRI*-Puffer (MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

1,5 µL RNase (10x)

0,5 µL Restriktionsenzym (*EcoRI*; Fermentas GmbH, St. Leon Rot)

1,5 µL Plasmid-Probe

10 µL PCR- H<sub>2</sub>O

Dieses Gemisch wurde durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig durchmischt und für mindestens 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

## 2.4 Experimente zum Nachweis von N-Fixierung

### 2.4.1 Ethin-Reduktion zum Nachweis von Nitrogenase-Aktivität

Der Ethin-Reduktionstest ist ein indirektes Nachweisverfahren für die Gegenwart aktiver Nitrogenase (Hardy *et al.* 1968). Jeweils vier Larven im letzten Larvenstadium (L3) oder zwei Arbeiterinnen wurden in Schraubampullen N 8-1 (Screw vials N 8-1; Machery-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) luftdicht verschlossen und zunächst 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl Luft mit einer gasdichten Spritze entnommen und zur Messung in das GC-Gerät manuell eingespritzt. Danach wurde eine Spritzenkanüle durch das Septum im Deckel des Vials geführt und mit einer zweiten Spritze 10 mL Ethin in das Vial appliziert (die Luft und überflüssiges Gas entwichen durch die erste Kanüle). Die Kanülen wurden entfernt und das Schraubglas mit den Versuchstieren und dem Ethin weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Es folgte eine Messung des Gases (10 µL wurden mit einer gasdichten Spritze in das GC-Gerät manuell eingespritzt). Die Gerätesoftware Xcalibur stellt die Ergebnisse der Analyse als Signalpeaks in einem Chromatogramm dar. Die Massenspektren dieser Peaks können mit einer Datenbank (NIST-Massenspektrenbibliothek) verglichen und so die Substanz identifiziert werden. Als weitere Proben wurde das verwendete Versuchsgas Ethin sowie zur Kontrolle eine Probe des zu erwartenden Produktes Ethen mit der GC vermessen.

Gerät: TRACE GC Ultra Tri Plus von Thermo Electron Corporation

Säule: SUPELCO; Bellefonte, PA, USA; SLBTM-5ms; Silica-Kapillarsäule 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm Beschichtungsdicke

Programm der GC-MS

Start	1 min bei 40 °C
Aufheizphase	Erhöhung um 25 °C pro min bis 80 °C
Ende	50 sec bei 80 °C

### 2.4.2 Isotopenexperimente: Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$

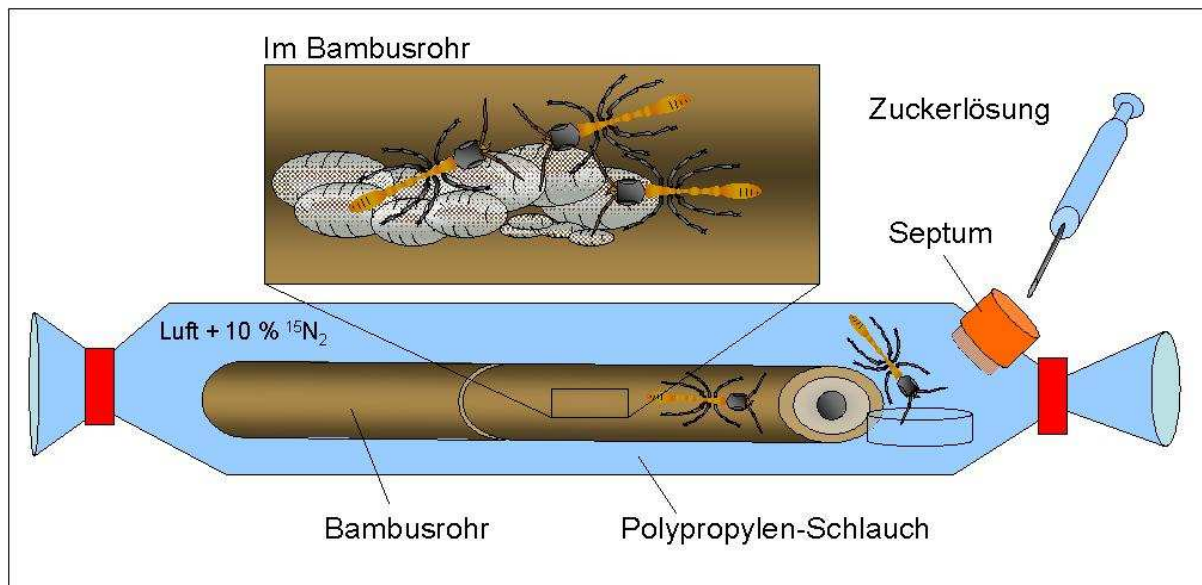
Die  $^{15}\text{N}_2$ -Methode zum Nachweis von N-Fixierung geht auf Burris und Wilson (1957) zurück. Teile der Kolonien (Domatien-Dornen der Ameisenakazien oder hohle Ästchen mit Ameisen und Larven) verschiedener *Pseudomyrmex*-Arten (*P. ferrugineus*, *P. gracilis*, *P. salvini*) wurden in einen gasdichten Polyethylenterephthalat (PET)-Schlauch (Bratschlauch, Toppits, Melitta, Minden, Deutschland) von etwa 1 L Volumen eingeschlossen. In die Folie wurde ein Septum eingefügt, durch welches mit einer Spritze 100 mL  $^{15}\text{N}_2$  (Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Steinheim, Deutschland) injiziert wurde. Durch einen Futterspender gefüllt mit 15 mL 10 %iger Saccharose in Leitungswasser (autoklaviert) konnten die Ameisen kontinuierlich mit Kohlenhydraten versorgt werden. Unter diesen Bedingungen konnten *P. ferrugineus* und *P. peperi* etwa eine Woche, *P. salvini* vier Wochen in einer 10 %  $^{15}\text{N}_2$  Atmosphäre gehalten werden. Durch das Einfrieren des gesamten Versuchsaufbaus wurde der Versuch am Ende der Versuchszeit abgebrochen. Die gefrorenen Arbeiterinnen und Larven konnten so leichter entnommen und gehandhabt werden.

Alle folgenden Schritte wurden von Dr. S. Bartram (im Labor von Prof. Dr. W. Boland, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena) durchgeführt.

Es wurden stets Proben (ganze getrocknete Ameisenlarven, Gaster oder Thorax der Arbeiterinnen von *P. gracilis* und *P. salvini*, ganze Arbeiterinnen bei der kleinwüchsigen *P. ferrugineus* mit Darminhalt und somit mit Bakterienflora) von ca. 1 mg abgewogen und in spezielle Zinnkapseln (d: 3.3 mm, l: 5 mm; part. No. HE 24055300SA HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland) gefüllt. Das exakte Gewicht wurde notiert. Diese Kapseln wurden verschlossen und über einen Autosampler einem Elementaranalysator (EuroEA CN2 dual, HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland) zugeführt, der die Proben in einem konstanten Heliumstrom (80 ml/min) quantitativ zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  verbrannte (Oxidation bei 1020 °C, Reduktion bei 650 °C). Nachdem die Verbrennungsprodukte eine Trocknungsstufe ( $\text{MgClO}_4$ ) durchlaufen hatten, erfolgte eine chromatographische Trennung der Gase ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) bei 85 °C, die schließlich dem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IsoPrime, Micromass, Manchester, UK) zugeführt wurden. Die Ergebnisse der Analyse des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  wurden als  $\delta^{15}\text{N} = [((^{15}\text{N}_{\text{sample}} / ^{14}\text{N}_{\text{sample}}) / (^{15}\text{N}_{\text{standard}} / ^{14}\text{N}_{\text{standard}})) - 1] \times 1000$  dargestellt ( $\delta^{15}\text{N}$  = Abweichung des Isotopenverhältnisses vom internationalen Standard). Die Angaben der Ergebnisse erfolgen in Promille (‰) bezogen auf den Gesamtstickstoffgehalt der Probe, die als *elemental composition* (Gesamtstickstoffgehalt) in Prozent (%) des Probengewichtes angegeben wird. Ein positiver Wert für  $\delta^{15}\text{N}$  indiziert demnach eine Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  in der Probe gegenüber dem Standard. Der für die Messungen verwendete Standard Acetanilid ( $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$ ; alice-1) wurde mit IAEA-Referenzproben (IAEA-N-1, mit einem  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von 0,43 ‰ relative zu  $\text{N}_2$  der Luft) kalibriert. Ein Coffein-Standard ( $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ ; caffee-1) wurde ebenfalls mit den Proben als QA-Referenzprobe für die Langzeit-Qualitätskontrolle des gesamten Versuchsaufbaus vermessen (Roland und Brand 2001).





**Abbildung 2.2: Versuchsaufbau Stickstoffisotopenexperiment**

Darstellung des Versuchsaufbaus zum Nachweis von N-Fixierung. Im Bambusrohr befinden sich weitere Ameisenarbeiterinnen und Larven. Weitere Beschreibung siehe Abschnitt 2.4.2.

---

## 2.5 Datenauswertung mittels Computerprogrammen

### 2.5.1 Auswertung der Sequenzdaten

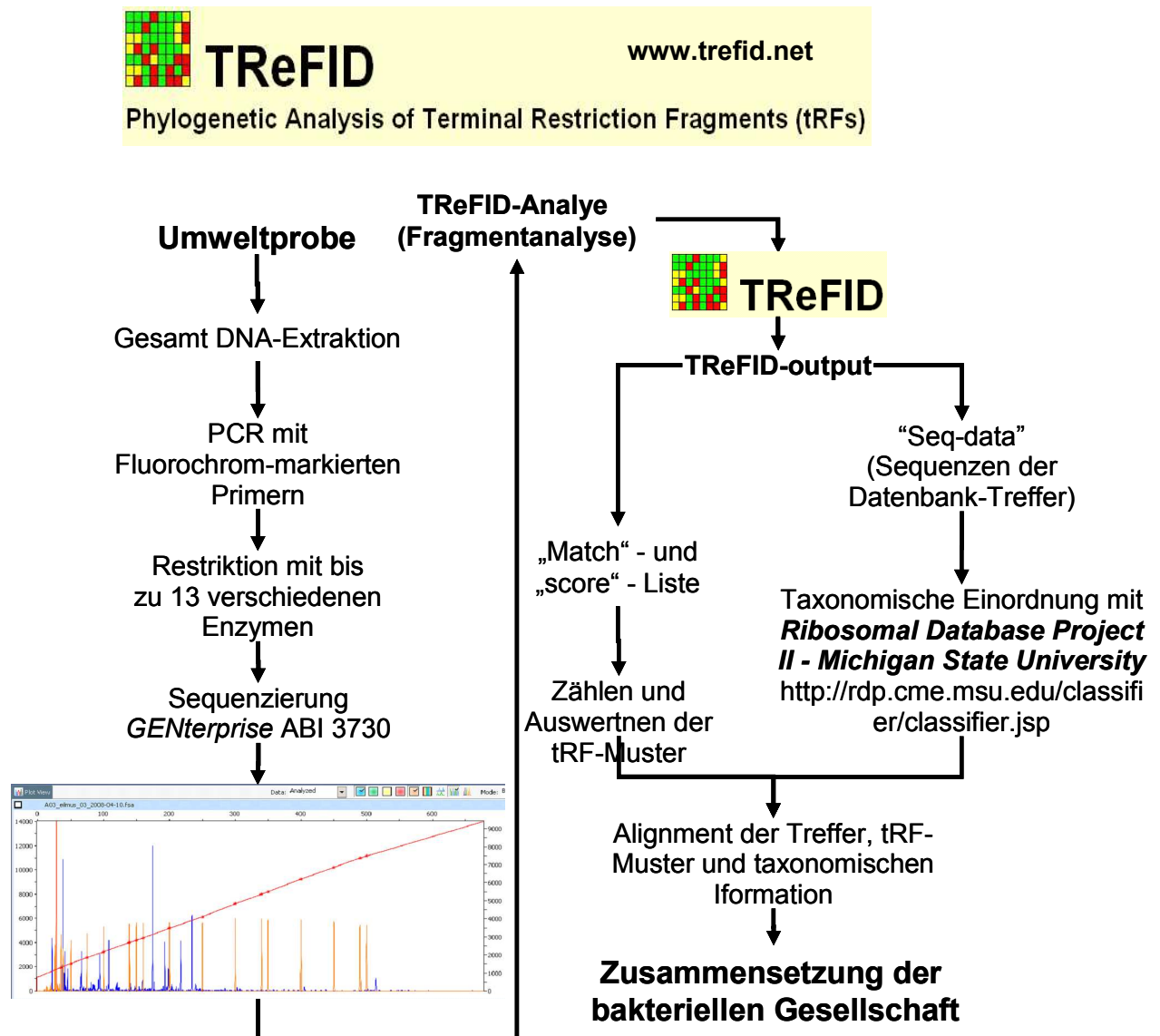
Zur Sequenzanalyse wurden die Programme BioEdit und ClustalX herangezogen, die zur Erstellung der Alignments verwendet wurden (für weitere Informationen siehe jeweilige Programmgebrauchsanweisungen). In Mit ClustalX wurden auch Bootstrap-Trees berechnet, die aber weniger die verwandtschaftlichen Beziehungen der Sequenzen untereinander, sondern vielmehr die Diversität allgemein wiedergeben sollten. Für die Zuordnung der Sequenzen zu bestimmten Taxa erschien das Programm daher als völlig hinreichend. Die Bestimmung der Sequenzen erfolgte über eine Blast-Suche bei GenBank (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und zusätzlich mit einem Online-Werkzeug, dem *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) (Wang *et al.* 2007)

### 2.5.2 TReFID-Software

Das Ergebnis der t-RFLP-Auswertung durch das halbautomatische Programm *Genescan*® 3.1.2 war für jedes Enzym (Restriktionsansatz) eine Tabelle, in der alle auftretenden *Peaks* d. h. Signale aufgeführt wurden. Dabei repräsentiert jedes Signal ein terminales Restriktionsfragment (t-RF), dessen Größe durch eine Eichgerade ermittelt wird. Diese

Tabellen dienen als Datengrundlage für die Analyse mit TReFID (*Terminal Restriction Fragment Identifying Program*). TReFID ist ein zur automatischen Analyse von t-RFLP-Daten entwickeltes Programm (Rösch und Bothe 2005). Bei 13 verschiedenen Restriktionsenzymen hat jeder Ribotyp ein unverwechselbares t-RF-Längenmuster (vergleichbar einem “Fingerabdruck”). Daher ermöglicht das Programm eine Zuordnung der t-RF zu allen nah verwandten Datenbankeinträgen (d. h. bekannten Mikroorganismen oder Sequenzdaten aus Umweltproben der NCBI-Datenbank). Das Programm vergleicht also die auftretenden t-RF-Längen mit den virtuell geschnittenen Datenbanksequenzen. Die Funktionsweise ist in der Einleitung unter Punkt 1.7 erklärt. Exemplarische TReFID-Ergebnistabellen befinden sich im Anhang. Das Programm TReFID steht in der stets aktuellen Version unter [www.trefid.net](http://www.trefid.net) zur freien Verfügung

.

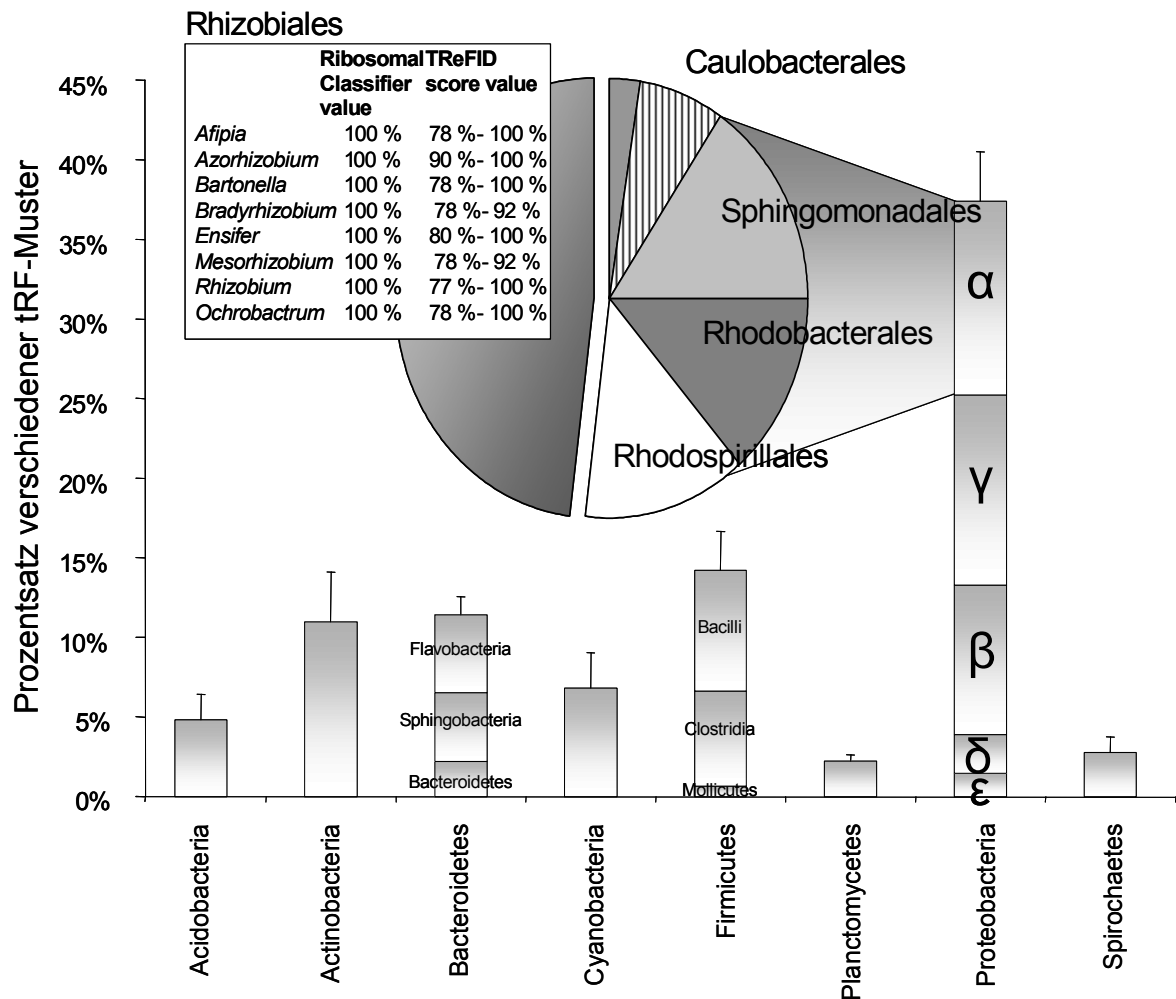


**Abbildung 2.3: Schema zur Verwendung von „TReFID“**

Arbeitsschritte der tRFLP-Analyse mit TReFID. Nach der Gesamt-DNA-Extraktion und der PCR mit fluorochrom-markiertem Primer werden die Amplifikate einem Restriktionsverdau mit 13 verschiedenen Enzymen in 13 separaten Ansätzen unterzogen. Es erfolgt das „Imaging“ z. B. mit einem ABI-Sequenzierautomaten (Kapillarsequenzierer oder Gelsequenzierer) und die anschließende Bestimmung der Fragmentgrößen mit Hilfe des Größenstandards und der jeweiligen Gerätesoftware. Die Daten der Fragmentgrößenbestimmung können einer TReFID-Analyse unterzogen werden. Das Ergebnis („output“) der Analyse wird zum einen als „match- und score“-Liste und zum anderen als Textdatei ausgegeben, die alle Referenzsequenzen der Treffer-Liste beinhaltet. Da stets auch viele taxonomisch nicht oder nicht richtig eingeordnete Sequenzdaten in der Datenbank (basiert auf der NCBI-Datenbank) enthalten sind, können diese mit Hilfe des Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) abgeglichen werden (Wang *et al.* 2007). Diese taxonomischen Informationen können dann mit der Liste der tRF-Muster abgeglichen und ausgewertet werden.

### 2.5.3 Bearbeitung und Aktualisierung der TReFID Referenzdatenbank

Hierbei kamen die Hilfsprogramme *GBSD* (in TReFID enthalten) und *PrimerSearch* (beide von Dr. C. Rösch entwickelte Hilfsprogramme) zum Einsatz. Bei der Aktualisierung bzw. Erstellung der TReFID-Datenbank wurde folgendermaßen verfahren: Die für die Datenbank gewünschten Einträge wurden bei NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) als *genbank-file* (gb) herunter geladen. Dieses Format konnte mit GBSD geöffnet und begutachtet werden. GBSD dient der Verwaltung der Datenbanken. Mit dem Programm können Einträge gelesen, bearbeitet, tRF-Längen prognostiziert und Datenbankeinträge in andere Formate (txt, FASTA oder TReFID.org) umgewandelt werden. Die Einträge wurden anschließend als TReFID-Format (eine TReFID.org-Datei) gespeichert. Nun wurde das Hilfsprogramm *PimerSearch* geöffnet. *PimerSearch* sucht selektiv nach Primerbereichen in der Sequenz des Datenbankeintrags. Neben einigen Primern, die dem Benutzer zur Auswahl stehen, kann auch jede beliebige Pimersequenz manuell eingegeben werden. Ferner lässt sich eine *maximum number of primer mismatches to template sequences* zwischen 0 und 9 festlegen (Siehe hierzu auch Abschnitte 3.4 und 4.3). Dies erlaubt eine Erhöhung oder Herabsenkung der Treffergenauigkeit. Nach der Festlegung des gewünschten Primers und der *primer mismatch number* konnte die zu bearbeitende Datei gesucht und der Suchvorgang gestartet werden. Dabei generierte das Programm eine txt-Tabelle, die für die weitere Bearbeitung notwendig war. Die TReFID.org-Datei wurde nun erneut mit GBSD geöffnet und über Optionen *Import AutoSeqMod table* wurde die zuvor von *PrimerSearch* erstellte txt-Tabellen-Datei geladen. Nun wurden die Datenbankeinträge mit dem Ergebnis der *PrimerSearch* verglichen und die resultierende Tabelle konnte erneut gespeichert werden. Diese Datei wurde nun abermals mit GBSD geöffnet und über Optionen *tRF Length* konnten die tRF-Längen für die verbliebenen Datenbankeinträge kalkuliert werden. Die Tabelle wurde nun wieder als TReFID.org-Datei gespeichert und konnte nun entweder als Datenbank in TReFID geladen werden, oder an eine bestehende TReFID-Datenbank über GBSD angehangen werden.



**Abbildung 2.4: Schema zur Auswertung von tRFLP-Daten mit TReFID**

Dies Schema illustriert die Auswertungs- und Fokussierungsmöglichkeiten von tRFLP-Auswertungen. Von den großen taxonomischen Einheiten wie Divisionen und Klassen ausgehend kann bis in den Bereich der Ordnungen, Familien und Gattungen fokussiert werden.

### Begriffsdefinitionen in Bezug auf das TReFID-Verfahren

**Referenzdatenbank (TReFID-Datenbank):** Datenbank mit derzeit 22.239 Einträgen von Bakterien- und Archaeen-16S rRNA-Gen-Sequenzen der GenBank (NCBI) mit allen dazugehörigen Informationen. Zusätzlich beinhalten die Einträge zur Kalkulation mit TReFID die ausgehend von der Sequenz kalkultierten tRF-Muster (Siehe folgende Definition).

**tRF-Muster (tRF pattern):** Jede Datenbanksequenz lässt sich durch einen Datensatz aus Restriktionsenzymen und zugehörigen tRFs beschreiben. Diese tRF-Längen entstehen durch unterschiedliche Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme. Dabei können Ähnliche Sequenzen (relative Verwandtschaft) das gleiche tRF-Muster ergeben, besonders bei der Betrachtung weniger Enzyme. Die Auswertung von TReFID-Ergebnislisten erfolgte auf der Basis von tRF-Mustern und nicht nur Treffern).

**Treffer (*hit*, *score*):** Eintrag in der TReFID-Ergebnisliste mit Angaben zum Übereinstimmungsgrad des detektierten Musters mit dem Datenbankeintrag, taxonomischen Daten zum Treffer sofern bekannt, Angaben zu dazugehörigen tRF-Muster und allen Informationen einschließlich Sequenz des GenBank-Datenbankeintrags bei NCBI.

Weitere Informationen sind den Originalveröffentlichungen (Rösch und Bothe 2005, Eilmus *et al.* 2007) und der HP: <http://www.trefid.net/> zu entnehmen.

#### **2.5.4 Statistik**

Für statistische Untersuchungen wurde Statistica 6 (*StatSoft*) verwandt. Wegen der sehr unterschiedlichen Stichprobenzahlen wurde in erster Linie der nichtparametrische Mann-Whitney U Test genutzt. Wurden prozentuale Werte zweier Verteilungen statistisch miteinander verglichen, wurden diese Werte arcsin-Transformiert (Wert/100 dann quadratische Wurzel, anschließend arcsin-Transformation) (Hogg und Craig 1995, Zar 1996). Diese Bearbeitung erfolgte in Microsoft Excel.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mit Akazien assoziierte Bakterien

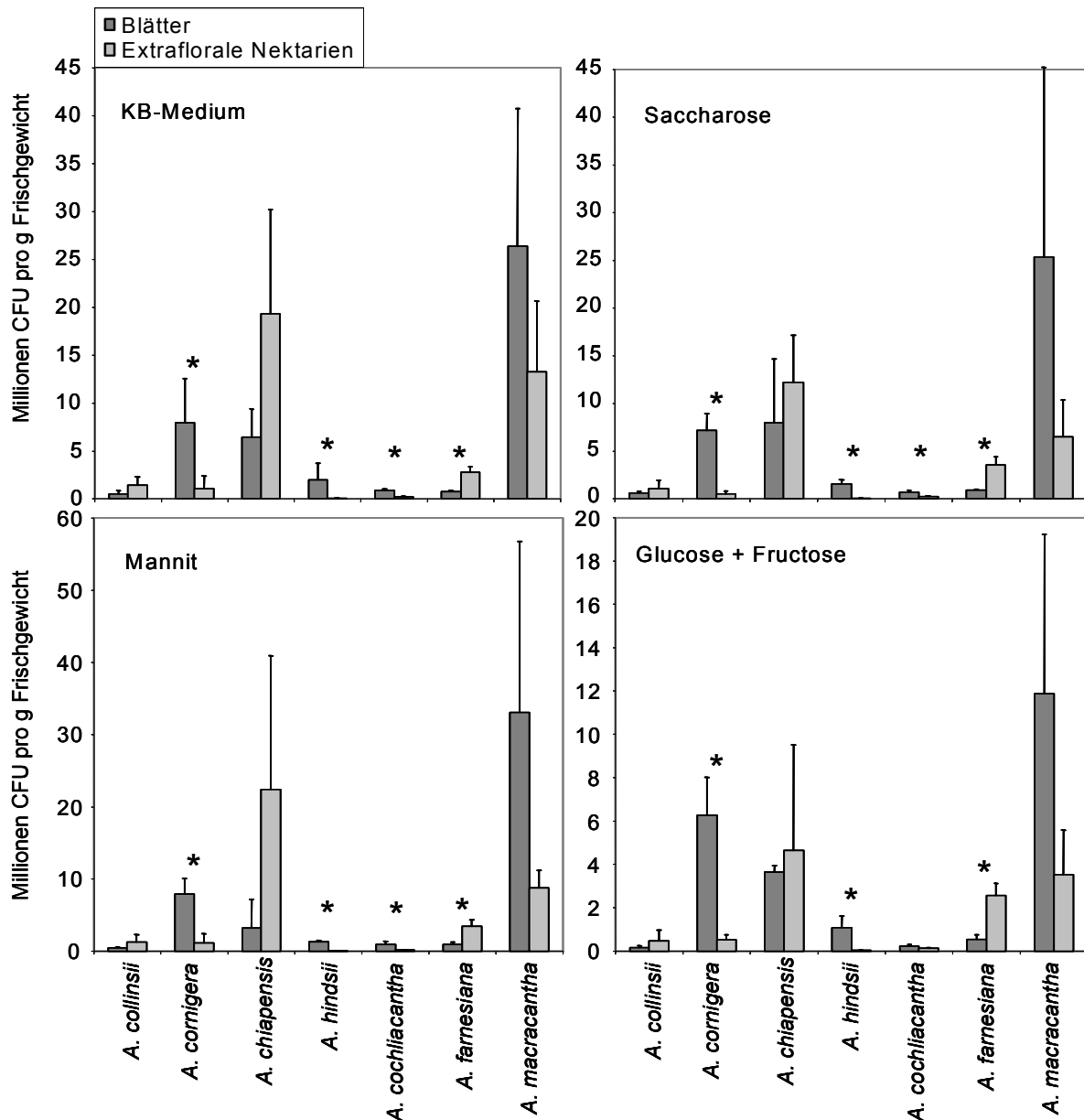
##### 3.1.1 Auswertung der CFU-Bestimmung der Akazien

Die Ergebnisse der CFU-Bestimmung für die verschiedenen *Acacia*-Arten sind in der Abbildung 3.1 illustriert. Im Falle des Mannit-Mediums wurden 9.947 CFU, für KB-Medium 9.635 CFU, für Saccharose-Medium 8.684 CFU und für Glucose-Fructose-Medium 6.896 CFU ausgezählt. Zusammengenommen wurden im Falle der Akazien 35.072 Kolonien ausgezählt. Ausgehend von diesen Werten konnte für die verschiedenen Akazienarten auf insgesamt zwischen 23.000 und 22 Millionen CFU pro Gramm Frischgewicht extraflorales Nektariengewebe und für Blattgewebe zwischen 43.000 und 33 Millionen CFU pro Gramm Frischgewicht geschlossen werden. Die im Vergleich höchsten CFU-Zahlen konnten sowohl für Blätter als auch für das Nektariengewebe bei allen vier verwendeten Kulturmedien für *Acacia macracantha* festgestellt werden. Die Anzahl der CFU für das Nektargewebe von *A. chiapensis* waren bei allen verwendeten Medien ebenfalls mit 20 Millionen CFU/g Frischgewicht (im Durchschnitt bei KB-Medium und Mannit-Medium) im Vergleich zu den anderen Arten sehr hoch. Die durchschnittliche CFU-Anzahl des dazugehörigen Blattmaterials lag bei 6,4 Millionen CFU/g Frischgewicht beim KB-Medium. Bei drei Akazienarten übertraf die Zahl der kultivierbaren Keime in den Blättern im Durchschnitt die Zahl der kultivierbaren Keime im Gewebe des Nektariums pro Gramm Frischgewicht: Statistisch abgesichert war eine niedrigere CFU-Anzahl im Nektargewebe gegenüber dem Blattgewebe (betrifft alle Nährmedien) bei *A. cornigera* (Glucose-Fructose:  $p = 0,017$ ;  $n = 10$ ; Mannit:  $p = 0,017$ ;  $n = 10$ ; Saccharose:  $p = 0,017$ ;  $n = 10$ ; KB:  $p = 0,030369$ ;  $n = 10$ ) [Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test], *A. hindsii* (Glucose-Fructose:  $p = 0,00617$ ;  $n = 11$ ; Mannit:  $p = 0,010516$ ;  $n = 10$ ; Saccharose:  $p = 0,019017$ ;  $n = 10$ ; KB:  $p = 0,025348$ ;  $n = 14$ ) und *A. cochliacantha* (Mannit:  $p = 0,020137$ ;  $n = 9$ ; Saccharose:  $p = 0,017623$ ;  $n = 11$ ; KB:  $p = 0,00617$ ;  $n = 11$ ). Siehe hierzu Abbildung 3.1. Demgegenüber erwies sich die CFU-Zahl im Nektargewebe von *A. farnesiana* bei allen verwendeten Nährmedien stets als höher als im dazugehörigen Blattgewebe (Glucose-Fructose:  $p = 0,010516$ ;  $n = 10$ ; Mannit:  $p = 0,020922$ ;  $n = 8$ ; Saccharose:  $p = 0,020922$ ;  $n = 8$ ; KB:  $p = 0,010516$ ;  $n = 10$ ). Keine statistischen belegbaren Unterschiede konnten in der CFU-Anzahl zwischen Blattgewebe und Nektariengewebe bei *A. collinsii*, *A. chiapensis* und *A. macracantha* nachgewiesen werden. Vergleicht man über die Artgrenzen hinaus ergaben sich schwachsignifikante Unterschiede

zwischen der CFU-Anzahl im Nektariengewebe auf KB-Medium von *A. chiapensis* zu *A. hindsii* ( $p = 0,02$ ) und zwischen *A. macracantha* und *A. hindsii* ( $p = 0,004$ ), wobei *A. hindsii* im Nektariengewebe bei allen Versuchen die geringste CFU-Anzahl und *A. chiapensis* und *A. macracantha* stets die durchschnittlich höchste CFU-Anzahl in den extrafloralen Nektarien aufwies. Dies traf auch auf das Mannit-Medium zu, bei dem die Keimzahl im Gewebe der extrafloralen Nektarien von *A. macracantha* die CFU-Anzahl von *A. hindsii* übertraf ( $p = 0,003$ ).

Zusammenfassend betrachtet konnten keine klaren Unterschiede der bakteriellen CFU-Anzahl in Blatt- und extrafloralem Nektariengewebe zwischen den beiden Akaziengruppen Myrmekophyten (*A. collinsii*, *A. hindsii*, *A. chiapensis*, *A. hindsii*) und myrmekophilen Akazien (*A. cochliacantha*, *A. farnesiana*, *A. macracantha*) nachgewiesen werden. Wie oben beschrieben sind statistisch abgesichert niedrigere CFU-Zahlen im extrafloralen Nektariengewebe gegenüber den dazugehörigen Blattproben bei den Myrmekophyten-Akazien *A. cornigera* und *A. hindsii*. Dies trifft auch auf die myrmekophile Akazie *A. cochliacantha* zu, wogegen die myrmekophile Akazie *A. farnesiana* stets höhere CFU-Zahlen im Nektariengewebe als im Blattgewebe aufwies. Weitere statistisch abgesicherte Aussagen waren aufgrund der großen Streuung der Daten nicht möglich.





**Abbildung 3.1: Anzahl der CFU pro 1 g Frischgewicht Pflanzenmasse der verschiedenen *Acacia*-Arten.**

Pro Art wurden drei Individuen besammelt (je drei Blätter und deren extrafloralen Nektarien pro Individuum). Es wurden die Kulturmedien KB und YEM<sup>+</sup> mit Mannit, Saccharose oder Glucose und Fructose als unterschiedliche C-Quellen verwendet (siehe Abschnitt 2.2). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede (Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test) zwischen der CFU-Anzahl von Blättern und extrafloralen Nektarien wurden gekennzeichnet (p \*<0,05; \*\*<0,001; \*\*\*<0,0001).

### 3.1.2 Bakterien auf und in Blättern sowie extrafloralen Nektarien

Mit den unter Abschnitt 2.2 beschriebenen Kulturmedien wurden bei der CFU-Bestimmung zahlreiche bakterielle Isolate in Mexiko gewonnen, die im Labor der Allgemeinen Botanik der Universität Duisburg-Essen weiterkultiviert werden konnten. Ein Teil der Isolate konnte mittels Sequenzierung des 16S rRNA-Gens identifiziert werden. Trotz verschiedener methodischer Ansätze gelang die DNA-Präparation bei einigen Isolaten nicht. Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Identifizierung der Isolate erfolgte mit NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und dem *Ribosomal Database Project II Classifier* (Michigan State University; <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) (Wang *et al.* 2007). Unter den Isolaten sind die  $\alpha$ -Proteobacteria mit Acetobacteriaceae, Methylobacteriaceae und Sphingomonadaceae, die  $\gamma$ -Proteobacteria mit Enterobacteriaceae und Pseudomonaceae, die Actinobacteria mit Microbacteriaceae, Williamsiaceae und Nocardiaceae, die Bacilli mit Bacillaceae 1 (insgesamt neun verschiedene Isolate, die jeweils mehrfach auftraten) vertreten. Unter diesen Bakterien befinden sich auch solche, die zu Endophyten nächst verwandt sind: *Microbacterium* als Endophyt von Zuckerrohr (Mendes *et al.* 2007), *Pantoea*-verwandt als Endophyt von Baumwolle, *Sphingomonas* als Endophyt von Papaya sowie *Williamsia* als assoziiert zu diversen Bäumen (Leigh *et al.* 2006) und *Methylobacterium* als assoziiert zu Schilf.

---

**Tabelle 3.1: Bakterien in Blätter und Nektarien der Akazien**

Aufstellung der identifizierbaren Isolate aus Blatt- oder Nektariengewebe der untersuchten Akazien. Die angegebenen Accessions-Nummern sind die derjenigen Organismen der Datenbank, die als die nächst ähnlichen zu den hier gefundenen Sequenzen identifiziert wurden. Anmerkungen zum Habitat bzw. zur Lebensweise gehen auf die jeweiligen GenBank-Einträge zurück.

Isolate	Isoliert aus	Nächst verwandt mit (GenBank; NCBI)	Gattung nach <i>Ribosomal Classifier</i> (Wang <i>et al.</i> 2007)	An- merkung
B11, F4	<i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Roseomonas</i> EF661571	<i>Roseomonas</i>	
A9, A10, C4, C5, C12, D2, F6, F7	<i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Microbacterium</i> <i>Frigoribacterium</i> EF602568 EU636015 DQ339618	<i>Microbacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i>	Endophyt von Zuckerrohr

		DQ358656		
B4, B5, B6, E12	<i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Williamsia Norcardia</i> EU341225 AJ920291 EU527075	<i>Williamsia</i>	Assoziiert mit diversen Bäumen
D3, D4, D5, D7	<i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Rhodococcus</i> DQ285075	<i>Rhodococcus</i>	
A5, E2	<i>Acacia hindsii</i> Nektarien; <i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Bacillus</i> EU193043 FJ413048	<i>Bacillus</i>	Mexiko
A3, D11	<i>Acacia cochliacantha</i> Blätter; <i>Acacia cornigera</i> Nektarien	Endophytic bacterium FJ205678	<i>Pantoea</i>	Endophyt von Baumwolle
B1, B2, E9, E10	<i>Acacia hindsii</i> Blätter; <i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Methylobacterium</i> EU860987 AB299701	<i>Methylobacterium</i>	Assoziiert mit Schilf
C1, F5	<i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Pseudomonas</i> EU741040	<i>Pseudomonas</i>	
A1, A7, A8, A11, B9, B10, C8, D10, E3, E8, F3	<i>Acacia macracantha</i> Blätter; <i>Acacia hindsii</i> Blätter und Nektarien; <i>Acacia cornigera</i> Nektarien	<i>Sphingomonas</i> EU839652 AY894691 EU448284 FJ204417	<i>Sphingomonas</i>	Endophyt von Papaya

### 3.1.3 Wurzelknöllchensymbiosen der untersuchten Akazien

Die im Feld isolierten und Kulturen von Knöllchenbakterien wurden zunächst in Deutschland mehrfach überimpft, um Kontaminationen auszuschließen. Zur Identifizierung wurde dann zunächst die bakterielle DNA extrahiert und eine 16S rDNA-PCR durchgeführt. Die Produkte der PCR wurden sequenziert und sowohl gegen die *NCBI*-Datenbank (*Blast*) als auch mit den *Ribosomal Database Project II* (*Michigan State University*; <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) abgeglichen (Wang *et al.* 2007). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 illustriert. Die myrmekophile Art *Acacia cochliacantha* und die myrmekophytische *A. chiapensis* wiesen Knöllchenbakterien auf, die vom *Ribosomal Database Project II Classifier* der Gattung *Rhizobium* zugeordnet wurden (Wang *et al.* 2007). Dies wird durch das *Blast*-Ergebnis gestützt. Die 671 nt lange Sequenz stimmte zu 99 % mit der Sequenz eines nodulierenden *Rhizobium*-Isolates (EF364373; Rincon *et al.* 2008) an *Ononis tridentata* überein. Ebenfalls der Gattung *Rhizobium* wurde der Symbiont von *A. hindsii* zugerechnet. Die Übereinstimmung mit *NCBI* Datenbanksequenzen zu *R. etli* betrug 100 % (EU488751). Der *Ribosomal Database Project II Classifier* identifizierte dagegen dieses Isolat mit 100 % als *Mesorhizobium*. Die nächst ähnlichen Sequenzen der Isolate von *A. collinsii* und *A. cornigera* (beides Myrmekophyten) wurden von *NCBI Blast* mit 99 % Sequenzübereinstimmung über 677 nt der Gattung *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) zugerechnet (*Sinorhizobium meliloti* FJ025127). Der *Ribosomal Database Project II Classifier* bestätigt diese Zuordnung. Die myrmekophile Akazie *A. farnesiana* wies als Knöllchenbakterium einen Vertreter der Gattung *Mesorhizobium* auf. Nächst ähnliche Sequenzen mit 100 % Übereinstimmung nach *Blast* war *Mesorhizobium plurifarum* (DQ859040). Obwohl das Isolat von *A. macracantha* kultiviert werden konnte, gelang dessen Identifikation bislang nicht.

Die Knöllchenbakterien der beiden verschiedenen Limabohnenstandorte wurden ebenfalls identifiziert. Das Isolat von *Phaseolus lunatus* aus Puerto Escondido erwies sich als Angehöriger der *Agrobacterium/Rhizobium*-Gruppe, wogegen das Isolat, dass aus Knöllchen der Limabohnenpopulation von Matias Romero gewonnen wurde, als Angehöriger der Gattung *Bradyrhizobium* identifiziert wurde. Nach *Blast* beträgt die Übereinstimmung zu *Bradyrhizobium elkanii* (GenBank-Accession: FJ025115) 98 %.

Im Rahmen der Examensarbeit von R. Knobloch 2007 bis 2008 im Labor der Allgemeinen Botanik, Universität Duisburg-Essen konnte gezeigt werden, dass die Isolate

von *Acacia cornigera*, *A. collinsii* und *Phaseolus lunatus* die Pflanzen dieser Arten im Labor reinfizieren. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der anderen Pflanzenarten in Deutschland konnte das Reinfektionsvermögen der anderen Isolate nicht überprüft werden.

---



**Abbildung 3.2:** Reinfektion einer Laborpflanze von *Acacia collinsii* mit dem Isolat *Ensifer sp.* EU842051.

---

**Tabelle 3.2: Aufstellung der mit den Akazien assoziierten Knöllchenbakterien**

Angegeben sind Wirtspflanze, Familien- und Gattungszugehörigkeit sowie GenBank-Accession-Nummer (NCBI). Sofern Versuchspflanzen zur Verfügung standen, wurde das Isolat auf sein Reinfektions- bzw. Nodulationsvermögen getestet. Das Isolat aus *A. macracantha* konnte nicht bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgte auf 16S rRNA-Genbasis mit dem *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) und über eine Blast-Suche der NCBI-GenBank.

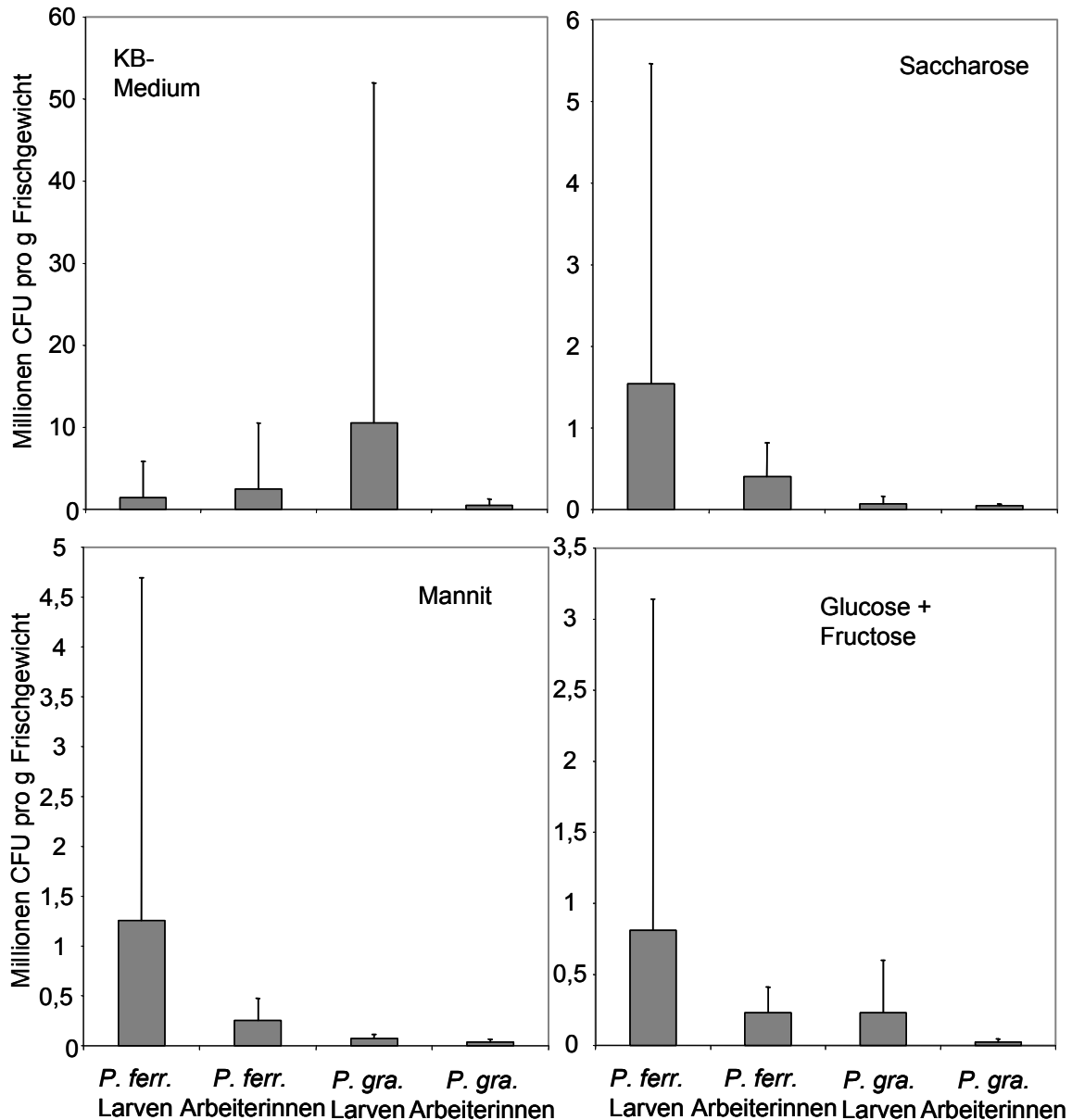
Wirt	Familie	Gattung	Datenbank-Nummer	Nodulation
<i>Acacia chiapensis</i> aus Matias Romero	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	EU842049 EU842034 EU842042	nicht durchgeführt (n. d.)
<i>A. cochliacantha</i>	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	EU842035 EU842043 EU842050	n. d.
<i>A. collinsii</i>	Rhizobiaceae Oxalobacteraceae	<i>Ensifer</i> <i>Herbaspirillum</i>	EU842051	positiv
<i>A. cornigera</i>	Rhizobiaceae	<i>Ensifer</i>	EU842037 EU842045 EU842052	positiv
<i>A. hindsii</i>	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	EU842039 EU842047 EU842054	n. d.
<i>A. farnesiana</i>	Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	EU842038 EU842046 EU842053	positiv
<i>A. macracantha</i>	-	-		n. d.
<i>Phaseolus lunatus</i> aus Puerto Escondido	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	EU842033 EU842041 EU842048	positiv
<i>Phaseolus lunatus</i> aus Matias Romero	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	EU842032 EU842040	positiv

## 3.2 Mit den Ameisen assoziierte Bakterien

### 3.2.1 Auswertung der CFU-Bestimmung der Ameisen

Für die Untersuchung wurden 12 Kolonien von *Pseudomyrmex ferrugineus* und 13 Kolonien von *P. gracilis* besammelt. Die Ergebnisse der CFU-Bestimmung für *P. ferrugineus* und *P. gracilis* sind in der Abbildung 3.3 illustriert. Es wurden 6.655 CFU auf KB-Medium, 1.221 CFU auf Mannit-Medium, 1.475 CFU auf Saccharose-Medium und 1.493 CFU auf Glucose-Fructose-Medium ausgezählt. Insgesamt wurden im Falle der beiden Ameisenarten *P. ferrugineus* und *P. gracilis* 10.718 Kolonien (CFU = Colony Forming Units) ausgezählt. Mit durchschnittlich 10,5 Millionen pro Gramm Frischgewicht war die Anzahl kultivierbarer

Keime auf KB-Medium, die aus Larven von *P. gracilis* gewonnen werden konnten, die höchste CFU-Zahl im Vergleich. Die CFU-Anzahl auf KB-Medium der *P. gracilis*-Larven erwies sich als deutlich höher als jene der Larven von *P. ferrugineus* ( $p = 0,037$ ; Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test). Die geringste kultivierbare Keimanzahl wurden in Arbeiterinnen von *P. gracilis* mit durchschnittlich 24.500 CFU pro Gramm Frischgewicht auf Glucose-Fructose-Medium gefunden. Auf den zuckerbasierten Medien erbrachten die Larven von *P. ferrugineus* die tendenziell höchsten durchschnittlichen Keimzahlen von 0,8 bis 1,5 Millionen CFU pro Gramm Frischgewicht, wobei dies (höhere CFU-Anzahl bei *P. ferrugineus* als *P. gracilis*) aufgrund der Streuung der Werte nicht statistisch abgesichert werden konnte. Die CFU-Anzahl auf KB-Medium aus *P. ferrugineus* Arbeiterinnen war jedoch signifikant ( $p = 0,026$ ) höher als die aus Larven.



**Abbildung 3.3: CFU pro 1 g Frischgewicht *P. ferrugineus* und *P. gracilis***

Für die Untersuchung wurden 12 Kolonien von *Pseudomyrmex ferrugineus* (*P. ferr.*) und 13 Kolonien von *P. gracilis* (*P. gra.*) besammelt. Pro Kolonie wurden drei Individuen (sowohl Larven als auch Arbeiterinnen) für die Untersuchung entnommen. Während die durchschnittlichen Keimzahlen auf allen Kulturplatten bei *P. ferrugineus*-Larven sehr ähnlich waren (1 bis 2 Millionen CFU/g Frischgewicht), war die durchschnittliche Keimzahl auf KB-Medium bei *P. gracilis*-Larven mit ca. 10 Millionen CFU/g Frischgewicht deutlich höher ( $p = 0,036988$ ). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.



### 3.2.2 Ergebnisse aus Kultivierung und Klonbibliothek

Durch die unter Abschnitt 2.2 beschriebenen Kultivierungsmethoden konnten verschiedene Bakterienstämme aus den Ameisen parallel zur CFU-Bestimmung isoliert und zur weiteren Bestimmung nach Deutschland transportiert werden. Unter den aus *P. ferrugineus* gewonnenen Isolaten waren die Gattungen *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Serratia* und *Variovorax* vertreten (Tabelle 3.3). Zusätzlich konnte *Weissella* über molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden. Eine ähnliche Zusammensetzung wurde in *P. gracilis* nachgewiesen: *Curtobacterium*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Weissella* und *Enterobacter*. Unter den Isolaten, die aus *P. salvini* gewonnen wurden, konnten *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterococcus* und *Lactococcus* bestimmt werden. Diese Informationen konnten zum Abgleich mit den Ergebnissen der tRFLP-Methode herangezogen werden (Abschnitt 3.2.3). Es stellte sich heraus, dass alle fraglichen Taxa auch in den Ergebnissen der TReFID-Analyse der tRF-Daten erscheinen.

#### Tabelle 3.3: Identifizierte Bakterien der drei Ameisenarten

Durch Kultivierungsverfahren und Anlage einer Klonbibliothek identifizierte Bakterien der drei untersuchten Ameisenarten. Nicht aufgeführt sind viele nicht näher identifizierbare Sequenzen von Actinobacteria, Bacilli,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria (vor allem Enterobacteriaceae). Die Datenbanknummern beziehen sich auf die Datenbank Genbank (NCBI) und stehen für jeweils eine partielle 16S rRNA-Gensequenz.

\*) Identifiziert mit *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

Wirt	identifiziertes Taxon	Gattung (wenn zu min. 98 % identifiziert)*	Datenbank-Nummer	Verfahren (PCR oder Kultivierung)
<i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> Arbeiterin	Actinobacteria: Streptomycetaceae		EU842058 EU842069	Kultur
	Bacilli: Bacillaceae 1	<i>Bacillus</i>	EU842064 EU842075	Kultur
	$\beta$ -Proteobacteria Burkholderiaceae	<i>Variovorax</i>	EU842076 EU842077	Kultur
	$\gamma$ -Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	EU842025 EU842028 EU842029 EU842030 EU842031 EU842059 EU842060 EU842061 EU842063 EU842070	Kultur PCR

			u. a.	
<i>Pseudomyrmex ferrugineus</i> Larve	Bacilli: Bacillaceae 1	<i>Bacillus</i>	EU842084	Kultur
	β-Proteobacteria Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	EU842087	Kultur
	β-Proteobacteria Burkholderiaceae	<i>Variovorax</i>	EU842082 EU842085	Kultur
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	EU841924 EU842071 u. a.	Kultur PCR
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	EU842056 EU842067 EU842068	Kultur PCR
	Bacilli: Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	EU841931	PCR
<i>Pseudomyrmex gracilis</i> Arbeiterin	Actinobacteria: Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	EU841973 EU841976	PCR
	β-Proteobacteria Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	EU842097	Kultur
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	EU841966 EU841985 EU841990 EU841962 EU841993	Kultur
	Bacilli: Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>	EU841963 EU841965 EU841967 u. v. a.	PCR
<i>Pseudomyrmex gracilis</i> Larve	Acetobacteraceae		EU842088	PCR
	β-Proteobacteria Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	EU842093	Kultur
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Pantoea</i>	EU841928	Kultur
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	EU842019	PCR
<i>Pseudomyrmex salvini</i> Larven (Laborkolonie)	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>		Kultur
	γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>		Kultur
	Bacilli: Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>		Kultur
		<i>Lactococcus</i>		Kultur

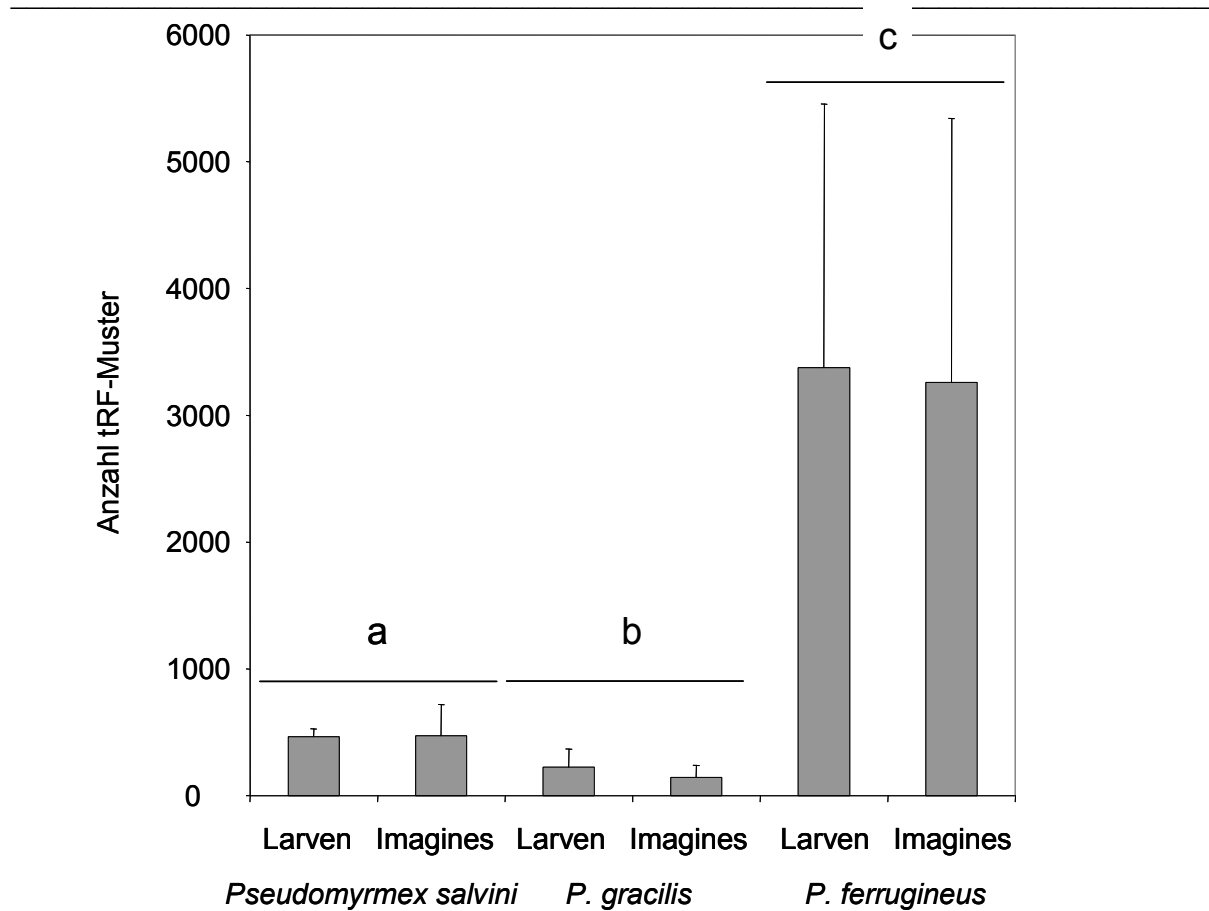
### 3.2.3 tRFLP-Analyse der mit den Ameisen assoziierten Bakteriengesellschaft

Die ursprünglich 17.462 Einträge zählende 16S rDNA Datenbank (Einträge = Referenzsequenz eines bekannten Bakteriums oder Umweltbakteriums mit prognostiziertem Restriktionsmuster und allen verfügbaren Informationen der *NCBI*-Datenbank) wurde für diese Studie auf 22.239 Einträge erweitert. Alle Einstellungen des Programms entsprachen den Grundeinstellungen (bei 13 Enzymen waren neun prognostizierte Fragmente notwendig, um einen Treffer in die Ergebnisliste aufzunehmen; es wurde von einem Fehler von  $\pm 0,5\%$  bei der Größenbestimmung der Fragmente mit *Peak Scanner v1.0* (Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgegangen).

Insgesamt konnten tRF-Muster von 30 mikrobiellen Klassen in den Proben nachgewiesen werden (Acidobacteria, Actinobacteria,  $\alpha$ -Proteobacteria, Anaerolineae, Aquificae, Bacilli, Bacteroidetes,  $\beta$ -Proteobacteria, Chlorobia, Chloroflexi, Clostridia, Cyanobacteria, Deferribacteres, Deinococci,  $\delta$ -Proteobacteria,  $\epsilon$ -Proteobacteria, Flavobacteria, Fusobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Mollicutes, Nitrospira, Planctomycetacia, Sphingobacteria, Spirochaetes, Thermoprotei, Thermotogae, TM7, Verrucomicrobiae). Acht Divisionen vereinten im Durchschnitt über 90 % aller tRF-Muster auf sich. Diese Divisionen waren Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria und Spirochaetes. Alleine vier Divisionen Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria machten einen Anteil von durchschnittlich 83 % der Gesamtdiversität aus (Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster).

Die quantitative Verteilung der tRF-Muster bei Larven und Arbeiterinnen aller Arten war sehr ähnlich und zeigte nur in wenigen Fällen signifikante Unterschiede. Deutliche Unterschiede zeigten sich in der Zahl detektierter tRF-Muster: Die durchschnittliche Zahl bei *P. gracilis* lag im Falle der Arbeiterinnen bei 144 ( $\pm 92$ ) und bei den Larven um 220 ( $\pm 144$ ). *P. salvini* kam auf durchschnittlich 463 ( $\pm 63$ ) und 472 ( $\pm 246$ ) für Larven und Arbeiterinnen. Signifikant höher war die Zahl detektierter tRF-Muster bei *P. ferrugineus* mit im Schnitt 3.379 ( $\pm 2.000$ ) Muster bei Larven und 3260 ( $\pm 2.000$ ) Muster bei Arbeiterinnen (Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test: *P. gracilis* gegen *P. ferrugineus*:  $p = 0,000758$ ; *P. salvini* gegen *P. ferrugineus*:  $p = 0,045501$ ; *P. gracilis* gegen *P. salvini*:  $p = 0,006551$ ; *P. salvini*:  $n = 6$ ; *P. gracilis*:  $n = 5$ ; *P. ferrugineus*:  $n = 7$ ). Die Diversität unterschiedlicher tRF-Muster erschien also bei *P. ferrugineus* deutlich größer als bei *P. salvini* und *P. gracilis* (Abbildung

3.4). Die hohen Standardabweichungen schließen eine Quantifizierung aus und lassen sich auf unterschiedliche Signalstärken der Proben zurückführen. Qualitativ und vom Anzahlverhältnis der verschiedenen taxonomischen Prokaryotengruppen innerhalb jeder einzelnen Analyse sind die Ergebnisse jedoch sehr ähnlich.



**Abbildung 3.4: Mittelwerte für die Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster für *Pseudomyrmex salvini*, *P. gracilis* und *P. ferrugineus*.**

Durchschnittliche Anzahl der tRF-Muster, die mit den TReFID-Analysen gewonnen wurden. Es konnten stets signifikant mehr tRF-Muster bei *P. ferrugineus* nachgewiesen werden als bei *P. gracilis* und *P. salvini* (diese signifikanten Unterschiede werden in der Abbildung durch die Buchstaben a, b, c markiert; c zu a und b sind jeweils signifikant unterschiedlich). Außerdem konnten mehr tRF-Muster für *P. salvini* als für *P. gracilis* detektiert werden (a zu b; Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test: *P. gracilis* gegen *P. ferrugineus*:  $p = 0,000758$ ; *P. salvini* gegen *P. ferrugineus*:  $p = 0,045501$ ; *P. gracilis* gegen *P. salvini*:  $p = 0,006551$ ). (*P. salvini*:  $n = 6$ ; *P. gracilis*:  $n = 5$ ; *P. ferrugineus*:  $n = 7$ ).

Die bakterielle Gemeinschaft der drei Ameisenarten wurde stark durch die Proteobakterien geprägt, die im Durchschnitt bei *P. ferrugineus* 51 %, bei *P. gracilis* 61 % und bei *P. salvini* 73 % aller determinierbaren tRF-Muster ausmachten. Im Detail konnten bei *Pseudomyrmex* tRF-Muster von fünf Klassen der Proteobakterien ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -

Proteobacteria) mit insgesamt 39 Familien identifiziert werden (Abbildung 3.6). Bei allen Proben der untersuchten Ameisenarten waren  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria besonders divers vertreten. Dabei wurden die  $\alpha$ -Proteobacteria überwiegend durch Rhizobiales (*Rhizobium*, *Bartonella*), gefolgt von Rhodospirillales, Rhodobacterales und Sphingomonadales, die  $\beta$ -Proteobacteria überwiegend durch Burkholderiales und die  $\gamma$ -Proteobacteria durch Pseudomonadales, Oceanospirillales, Enterobacterales repräsentiert (Abbildungen 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 und Tabelle 3.4).

Es folgt eine Aufstellung der Ergebnisse der tRF-Analyse für die drei untersuchten Arten *P. ferrugineus*, *P. gracilis* und *P. salvini*. Sofern über die tRF-Analyse Taxa detektiert werden konnten, die ebenfalls mit alternativen Methoden (Kultivierung und 16S rDNA-Klonbibliothek) nachgewiesen werden konnten, wurde dies vermerkt. Diese doppelte Bestätigung konnte nicht für alle Gruppen erbracht werden, da nur ein kleiner Teil der Bakterien mit den zur Verfügung stehenden Methoden kultiviert werden konnte (z. B. alle intrazellulären Bakterien wie Rickettsiales und Mollicutes sind bislang nicht außerhalb des Wirts kultivierbar) und auch über die stichprobenartige 16S rDNA-Klonierung nur ein Ausschnitt der Diversität erfasst werden konnte. Für weitere Anmerkungen siehe hierzu Abschnitt 3.4 Überprüfung von TReFID.

### **3.2.3.1 Bakterielle Diversität bei *Pseudomyrmex ferrugineus***

Es wurden die Arbeiterinnen und Larven (drittes Larvenstadium) von drei Kolonien (in den Abbildungen als A, B und C beschriftet) zur Analyse verwandt. Zusätzlich wurden die Larven einer weiteren Kolonie zu Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in sieben unabhängigen Versuchsdurchläufen und Analysen untersucht. Die Durchschnittswerte dieser vierten Kolonie wurden ebenfalls den hier aufgeführten Ergebnissen angefügt.

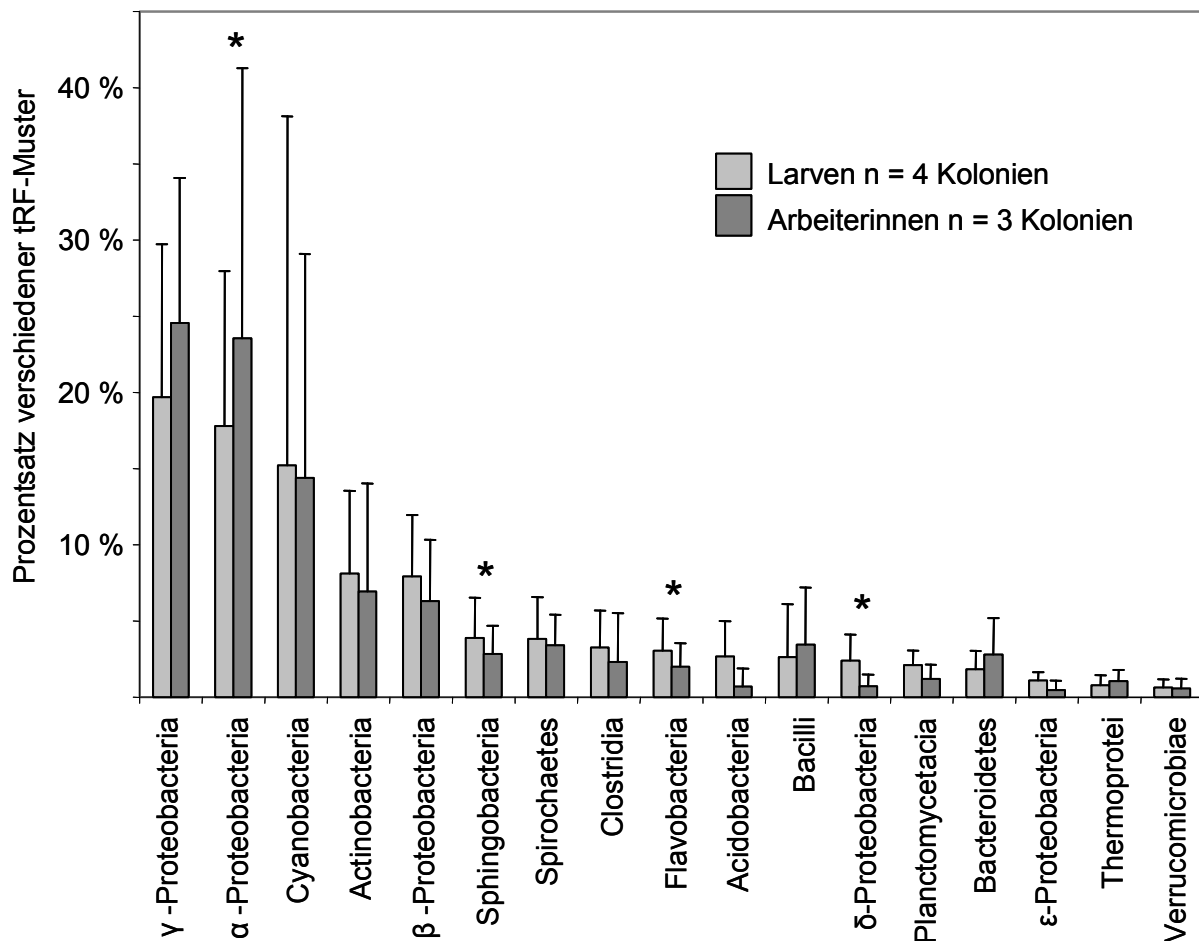
Mit über 5000 detektierten tRF-Mustern waren die Analysen der Larven von Kolonie C, die Larven der Kolonie der Reproduktionsversuche und die Arbeiterinnen von Kolonie A jene Analysen mit den höchsten Trefferzahlen. Einen Überblick über die nachgewiesenen Klassen im Vergleich von Larven zu Arbeiterinnen bietet Abbildung 3.5 und 3.6.

Ein Großteil der Muster geht auf Proteobakterien zurück.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien stellen den überwiegenden Teil dieser tRF-Muster. Die  $\beta$ -Proteobakterien sind jedoch auch in allen Analysen vertreten und werden überwiegend durch Burkholderiales-spezifische Muster repräsentiert. Auf die genaue Zusammensetzung der Muster der Proteobacteria wird weiter unten eingegangen.

**Actinobacteria.** Durchschnittlich 7 % bis 8 % aller Muster wurden dieser Division zugeordnet. Diese Muster verteilten sich auf die Ordnungen Actinomycetales, Bifidobacteriales, Coriobacteriales und Rubrobacterales. Die Gattungen *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium* und *Scardovia* wurden mit hoher Trefferwahrscheinlichkeit („score“-Werte) identifiziert. Über alternative Verfahren (PCR und Kultivierung) konnten die Gattungen *Curtobacterium* und *Streptomyces* bestätigt werden.

**Spirochaetes.** Etwa 3 % bis 4 % der Muster fielen auf die Spirochaeten. Die tRF-Muster der Gattungen *Borrelia*, *Brachyspira*, *Brevinema*, *Leptospira* und *Treponema* stimmten zu 100 % mit den in der Probe gefundenen Mustern überein. Allerdings wiesen alle Muster eine große Ähnlichkeit zueinander auf.

**Sphingobacteria.** Die zur Division Bacteroidetes gerechneten Sphingobacteria machten etwa 3 % bis 4 % der tRF-Muster der Untersuchung von *P. ferrugineus* Larven und Arbeiterinnen aus. Eine genauere Identifizierung der Referenzsequenzen der Datenbank war nicht möglich.



**Abbildung 3.5: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus*.**

Diversität der Bakteriengemeinschaft assoziiert mit *P. ferrugineus*. Diese Grafik basiert auf der Auswertung von insgesamt 20.817 tRF-Mustern („fingerprints“) aus sieben Analysen. Das Maß der Diversität eines jeden Taxon wurde dabei relativ zur Anzahl aller detektierten tRF-Muster für jede einzelne Analyse gesetzt. Für die Larven dienten vier Kolonien und für die Arbeiterinnen drei Kolonien als Grundlage. Signifikante statistische Unterschiede der bakteriellen Diversität zwischen Larven und Arbeiterinnen ergaben sich für α-Proteobacteria, Sphingobacteria, Flavobacteria und δ-Proteobacteria (markiert mit \*, Statistische Untersuchung mit Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test; α-Proteobacteria: p-Wert 0,049535; Sphingobacteria: p-Wert 0,049535; Flavobacteria: p-Wert 0,049535; δ-Proteobacteria: p-Wert 0,049535; signifikanter Unterschied bei  $p < 0.05$ ).

**Acidobacteria.** Zwischen 0,7 % und 2,7 % der tRF-Muster der Untersuchung ließen sich den Acidobacteria zuordnen. Bei allen Referenzsequenzen der Ergebnislisten der TReFID-Analyse handelte es sich um unkultivierte nicht näher bestimmte Acidobacteriaceae, die mit Hilfe des Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) als Angehörige der Gruppe Gp1 identifiziert werden (Wang *et al.* 2007).

**Clostridia.** 2 bis 3 % der tRF-Muster konnten den grampositiven und überwiegend anaeroben Clostridien zugerechnet werden. Nach Vergleichen der Referenzsequenzen mit NCBI-

Datenbankeinträgen gingen die detektierten Muster auf einen unkultivierten Vertreter der Gattung *Ruminococcus* zurück.

**Flavobacteria.** Mit 2 % bis 3 % stellten auch die Flavobakterien eine wenig diverse Gruppe in den untersuchten Proben dar. Die tRF-Muster wiesen auf folgende Gattungen hin: *Aequorivita*, *Capnocytophaga*, *Cellulophaga*, *Cloacibacterium*, *Flavobacterium* und *Mesonina*. Die tRF-Muster aller dieser Gattungen waren sehr ähnlich und eine genauere Auflösung war mit der angewandten Methode für diese Gruppe nicht möglich.

**Cyanobacteria.** Drei der vier untersuchten Kolonien wiesen einen Anteil von 1 % bis 7 % der tRF-Muster auf, die zu den Cyanobakterien gerechnet werden konnten. Im Falle von Kolonie 3 lag der Anteil sogar bei 49 %. Der Großteil der dazugehörigen Sequenzen der Referenzdatenbank ließen sich mit Hilfe des *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) als Zugehörige der Cyanobakterienfamilien 3.1, 4.1 und 1.1 zuordnen.

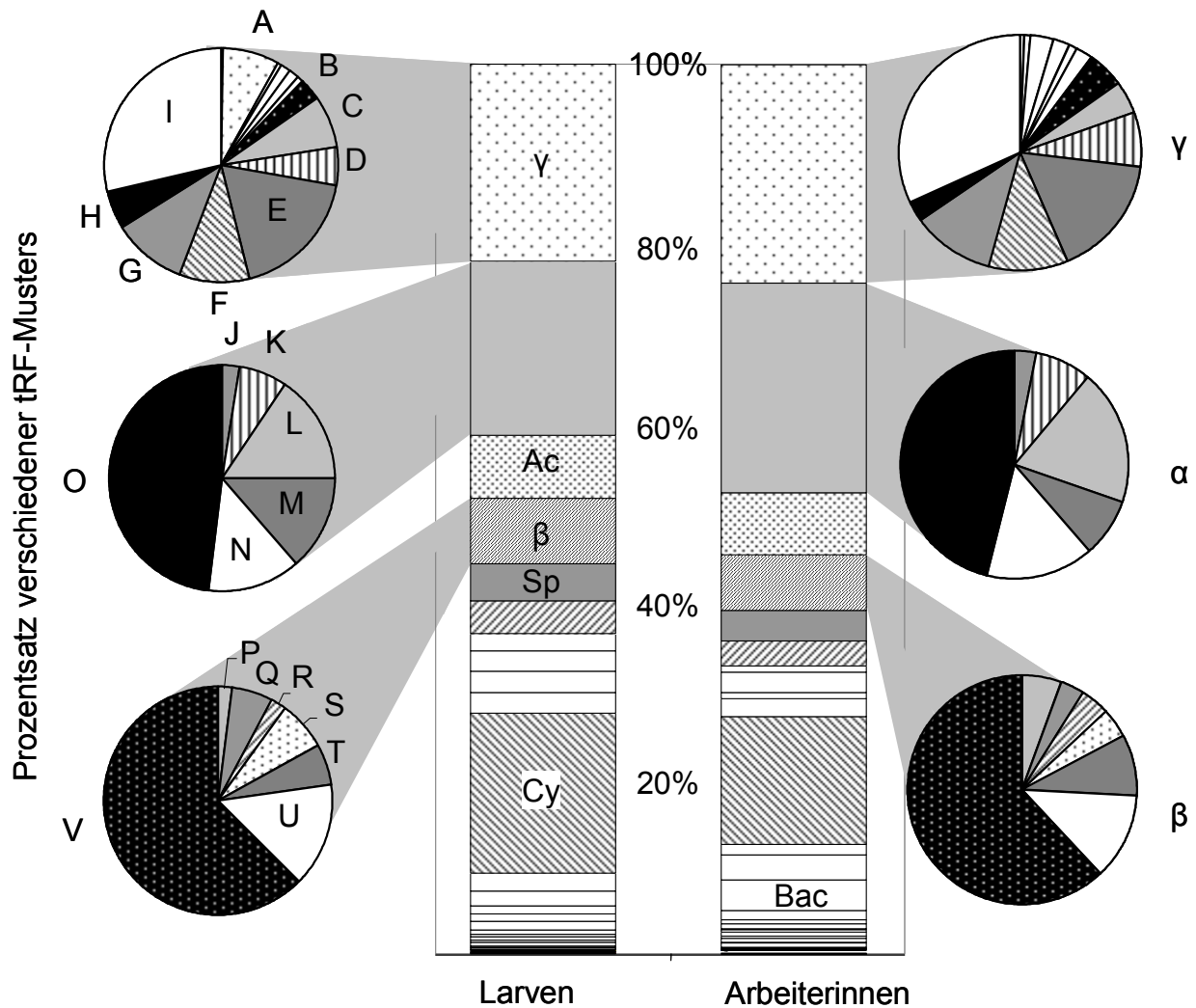
**Planctomycetacia.** Auch diese Gruppe war mit charakteristischen tRF-Mustern in allen Proben vertreten. Der Anteil lag bei durchschnittlich 2 % aller tRF-Muster. Diese Muster ließen sich den Gattungen *Pirellula*, *Planctomyces*, *Gemmata* und *Isosphaera* zuordnen.

**Bacteroidetes** (ausgenommen Sphingobacteria und Flavobacteria). Durchschnittlich 2 % bis 3 % der tRF-Muster ließen sich auf diese Gruppe zurückführen. Den Mustern zur Folge schienen Vertreter der Familien Rikenellaceae und Bacteroidaceae in den Proben vorhanden zu sein. Eine genauere Identifizierung war hier aufgrund der vorhandenen Datenbankeinträge nicht möglich.

**Bacilli.** 2,6 % bis 3,4 % der tRF-Muster deuteten auf die Gegenwart dieser grampositiven Gruppe. Folgende Taxa konnten dabei mit Hilfe des Ribosomal Database Project II (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) identifiziert werden: Bacillaceae: *Bacillus*; Paenibacillaceae: *Brevibacillus*; Lactobacillales: *Enterococcus*, *Lactobacillus*; Streptococcaceae: *Streptococcus*; Leuconostocaceae: *Weissella*. Die Gattungen *Bacillus*, *Enterococcus* und *Weissella* konnten mit alternativen Methoden bestätigt werden.

**Thermoprotei.** Bis zu 1 % der tRF-Muster wurden von TReFID Thermoprotei zugerechnet – einer Klasse des Phylums Crenarchaeota. Eine genauere Auflösung war nicht möglich.





**Abbildung 3.6: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus* – Proteobakterien hervorgehoben.**

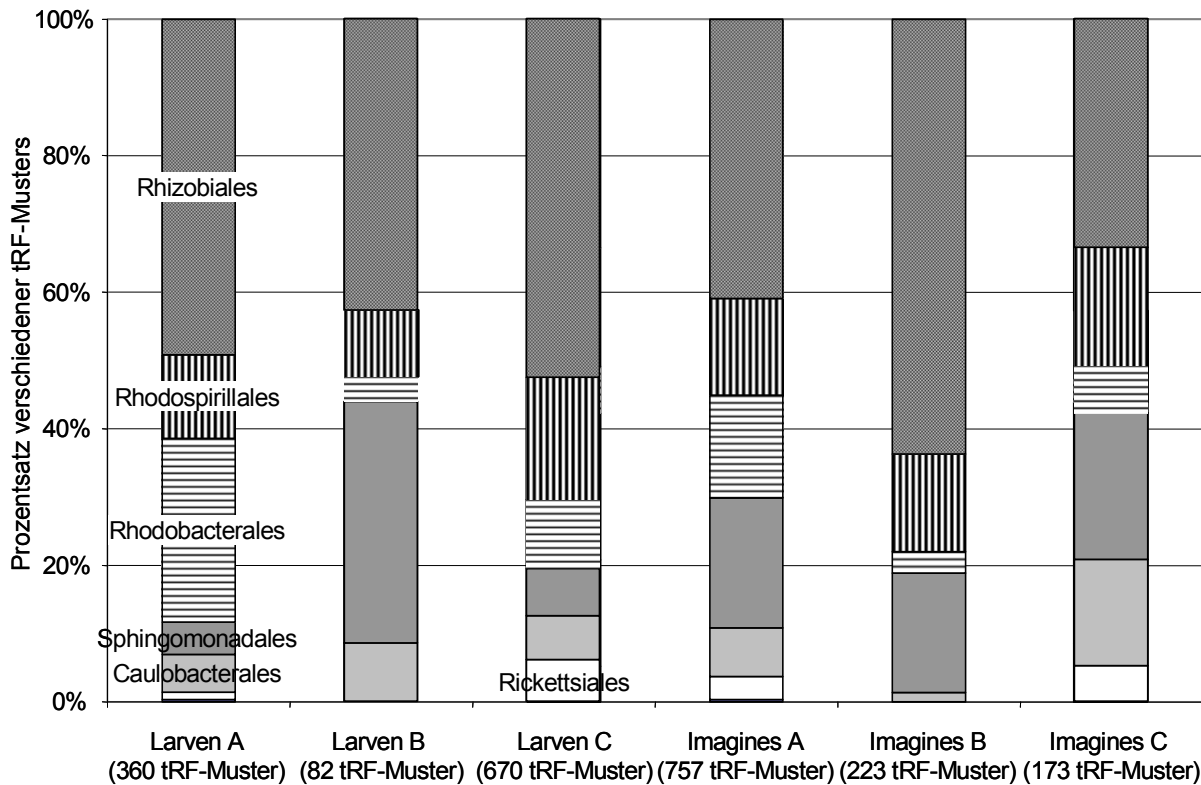
Bakterielle Gemeinschaft in Larven und Arbeitern von *P. ferrugineus*. Der relative Anteil unterschiedlicher tRF-Muster (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“) der verschiedenen Taxa wird getrennt für Larven (n = 4 Kolonien) und Arbeiterinnen (n = 3 Kolonien) dargestellt. Die Zusammensetzung der α-, β- und γ-Proteobacteria wird für Larven und Arbeiterinnen hervorgehoben, weil Proteobakterien gut 50 % der Gesamtdiversität, der mit den Ameisen assoziierten Gemeinschaft ausmachen. α-, β- und γ: α-, β- und γ-Proteobacteria; Ac: Actinobacteria; Bac: Bacilli; Cy: Cyanobacteria; Sp: Spirochates; A: Acidithiobacillales; B: Thiotrichales; C: Chromatiales; D: Xanthomonadales; E: Oceanospirillales; F: Enterobacteriales; G: Alteromonadales; H: Pasteurellales; I: Pseudomonadales; J: Rickettsiales; K: Caulobacteriales; L: Sphingomonadales; M: Rhodobacterales; N: Rhodospirillales; O: Rhizobiales; P: Nitrosomonadales; Q: Procabacteriales; R: Hydrogenophilales; S: Methylophilales; T: Neisseriales; U: Rhodocyclales; V: Burkholderiales.

**Proteobacteria.** Im Falle der Arbeiterinnen durchschnittlich 45 %, im Falle der Larven durchschnittlich 54 % aller tRF-Muster ließen sich auf die drei Gruppen der Proteobacteria ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria) zurückführen. Die Proteobakterien stellten damit die diverseste Gruppe der Untersuchung dar.

**$\alpha$ -Proteobakterien.** 18 % bis 23,5 % aller tRF-Muster konnten auf diese Division zurückgeführt werden. Die weitere Zuordnung der gruppenspezifischen tRF-Muster ergab (jeweils durchschnittlich für alle vier Analysen zusammengefasst) 48 % Rhizobiales, 13 % Rhodospirillales, 16 % Sphingomonadales und 14 % Rhodobacterales (Abbildung 3.7). Ebenfalls vorhanden waren spezifische Muster für Rickettsiales und Caulobacterales. Die Rhizobiales konnten mit folgenden Taxa nachgewiesen werden: Bradyrhizobiaceae (*Afipia*), Rhizobiaceae (*Agrobacterium*, *Ensifer*, *Rhizobium*), Aurantimonadaceae (*Aurantimonas*), Hyphomicrobiaceae (*Azorhizobium*), Bartonellaceae (*Bartonella*), Phyllobacteriaceae, Methylobacteriaceae. Die Übereinstimmung der in der Probe detektierten tRF-Muster mit den angegebenen Familien (und Gattungen) lag bei 100 %.

Die für die Rhodospirillales spezifischen tRF-Muster deuteten auf die Gegenwart verschiedener Vertreter der Familien Acetobacteriaceae (*Roseomonas*, *Gluconacetobacter*) und Rhodospirillaceae hin. Die Ordnung Sphingomonadales schien nur Vertreter der Familie Sphingomonaceae zu umfassen. Isolate, die sich der Gattung *Sphingomonas* zuordnen lassen (Sequenzübereinstimmung 99 % bis 100 %), wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiederholt aus verschiedenen Akazienarten isoliert und kultiviert (siehe Abschnitt 3.1.2).

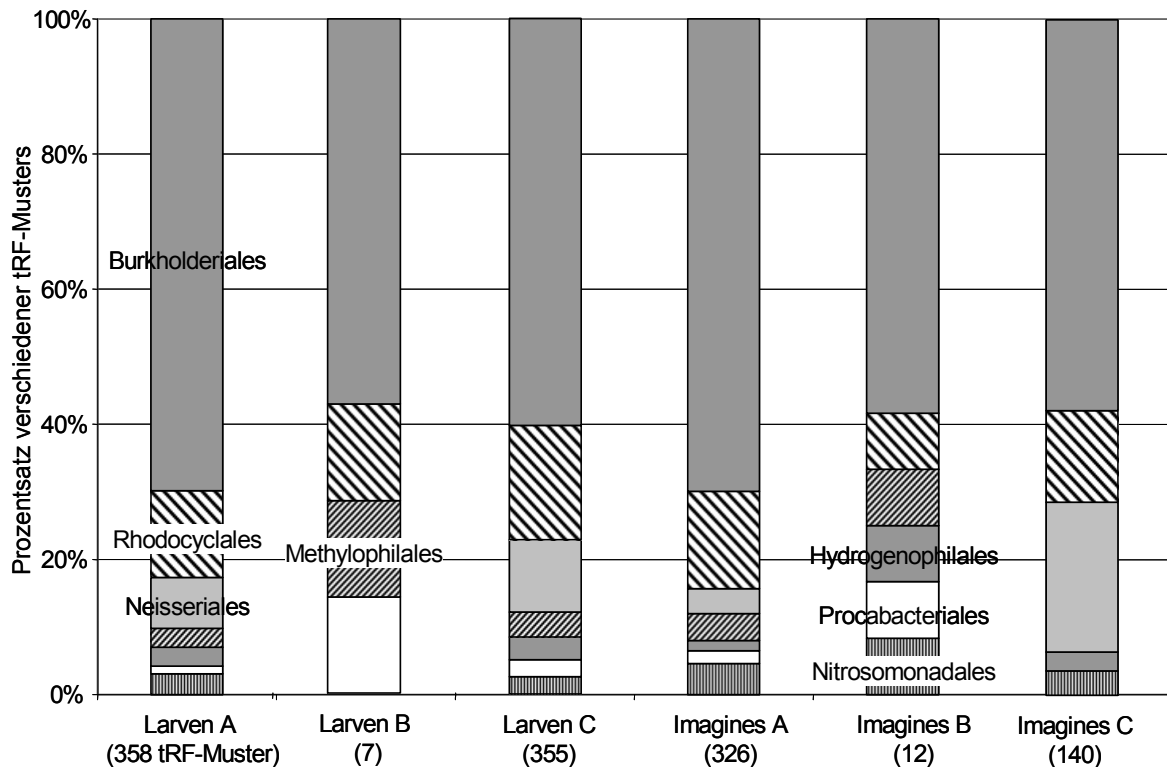
Erwähnenswert ist der positive Befund für Vertreter der Ordnung Rickettsiales für alle untersuchten Ameisenkolonien, da es sich um strikt intrazelluläre Bakterien handelt. Die Kolonien waren mit sehr großer Wahrscheinlichkeit alle mit einem Vertreter der Gattung *Wolbachia* (Anaplasmataceae) und/oder *Rickettsia* (Rickettsiaceae) infiziert. Eine sichere Zuordnung war aufgrund der verfügbaren Daten nicht möglich, weil in der Referenzdatenbank (GeneBank; NCBI) diese Einträge als *Wolbachia pipientis* aufgeführt werden, während der Classifier des *Ribosomal Database Project II* diese Sequenzen zu 100 % als *Rickettsia* identifiziert (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der  $\alpha$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus*.**

Diversität der  $\alpha$ -Proteobakterien in *P. ferrugineus*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien A, B und C jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Anzahl der tRF-Muster (in Klammern). Rhizobiales, Rhodobacterales und Rhodospirillales sind in allen Kolonien vertreten. Kolonien A und C weisen eine Infektion mit Rickettsiales auf.

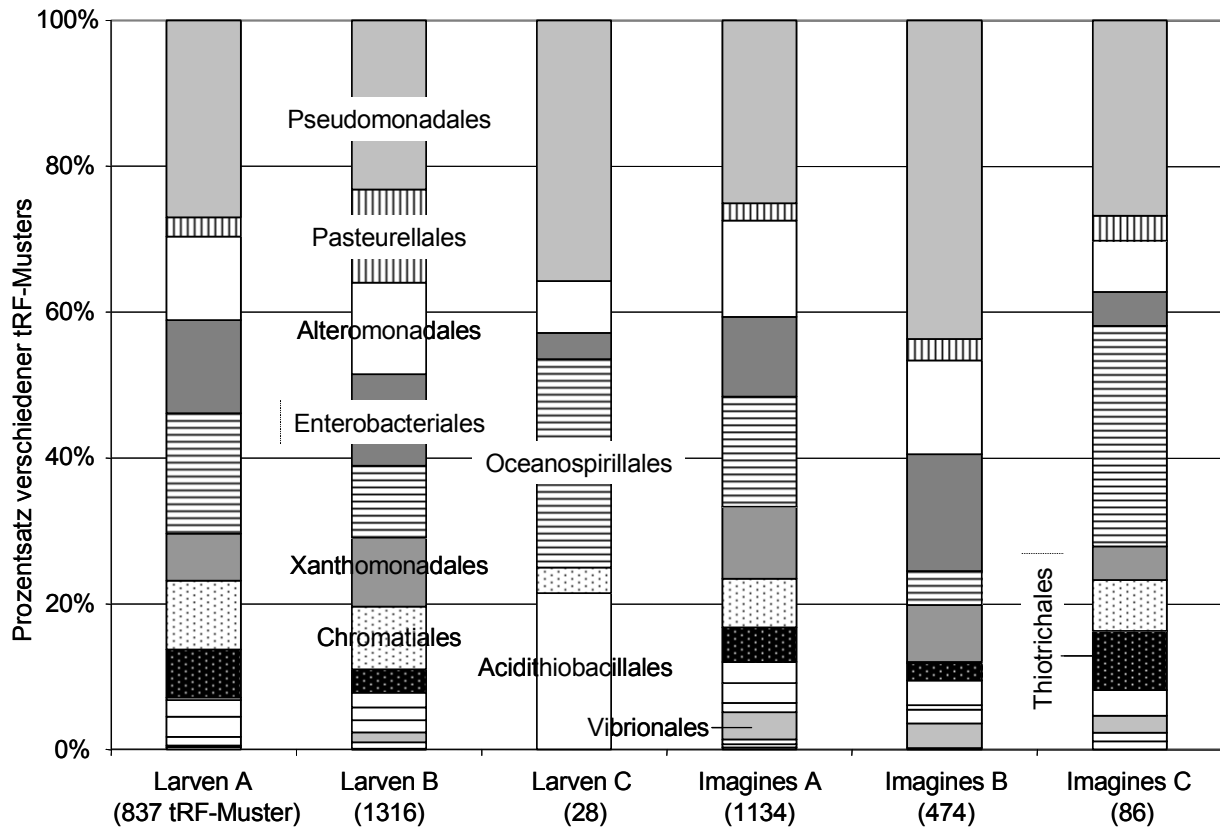
**$\beta$ -Proteobakterien.** Der weitaus größte Teil der spezifischen tRF-Muster für die Division  $\beta$ -Proteobacteria konnte auf die Ordnung Burkholderiales zurückgeführt werden (Abbildung 3.8). Dass diese Gruppe divers in den Ameisen vertreten ist, konnte ebenfalls über Sequenzierung und Kultivierung nachgewiesen werden. Die Gattungen *Burkholderia*, *Cupravidus*, *Pandoraea*, *Variovorax* sowie ein Vertreter aus der Gruppe „Burkholderiales Incertae sedis 5“ erschienen sowohl in den Ergebnislisten der TReFID-Analyse der tRF-Muster als auch durch alternative Methoden (Kultivierung, Klonierung und Sequenzierung).



**Abbildung 3.8: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der  $\beta$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus*.**

Diversität der  $\beta$ -Proteobakterien in *P. ferrugineus*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien A, B und C jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Zahl der tRF-Muster. Etwa 60 % der tRF-Muster weisen auf die Präsenz von Bakterien der Ordnung Burkholderiales hin.

**$\gamma$ -Proteobakterien.** Die Division der  $\gamma$ -Proteobakterien vereinte auf sich in allen Analysen die größte Zahl unterschiedlicher tRF-Muster auf sich. Durchschnittlichen 20 % (Larven) bis 25 % (Arbeiterinnen) aller auftretenden Muster konnten dieser Gruppe zugeordnet werden (Abbildung 3.9). Der Großteil der detektierten Muster erwies sich als spezifisch für folgende Gruppen: Pseudomonadales (Moraxellaceae: *Acinetobacter*; Pseudomonaceae: *Pseudomonas*), Pasteurellales (Pasteurellaceae: *Actinobacillus*), Alteromonadales (Alteromonadaceae: *Alteromonas*, Pseudoalteromonadaceae: *Pseudoalteromonas*, Shewanellaceae: *Shewanella*), Enterobacteriales (Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Serratia*) und Oceanospirillales.



**Abbildung 3.9: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der  $\gamma$ -Proteobakterien nach Ordnungen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus*.**

Diversität der  $\gamma$ -Proteobakterien in *P. ferrugineus*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien A, B und C jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Zahl der tRF-Muster. In allen Kolonien sind Pseudomonadales, Alteromonadales, Enterobacteriales und Xanthomonadales präsent.

**$\delta$ -Proteobacteria.** Für  $\delta$ -Proteobakterien spezifische tRF-Muster konnten in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden, machten aber mit bis zu 2 % stets nur einen kleinen Teil der Gesamtdiversität aus. Die tRF-Muster wiesen auf die Gegenwart von Bakterien hin, die mit den Gattungen *Bacteriovorax* und *Bdellovibrio* (*Ribosomal Database Project II*). verwandt waren.

**Tabelle 3.4: TReFID - Beste Treffer *Pseudomyrmex ferrugineus***

Die hier aufgeführten TReFID-Ergebnisse (Treffer) umfassen durchschnittlich 94 % aller bei *P. ferrugineus* detektierten tRF-Muster. Demnach setzt sich die mikrobielle Diversität der mit *P. ferrugineus* assoziierten Bakteriengemeinschaft aus 10 Klassen, die mit zumindest 36 Familien und mindestens 86 Gattungen vertreten sind, zusammen. 13 der 86 hier aufgeführten mikrobiellen Gattungen konnten durch klassische Methoden (Kultivierungsverfahren und 16S rDNA-PCR-Stichproben) bestätigt werden.

\*) Identifiziert mit *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

\*\*) Der TReFID “score” bezieht sich auf die Übereinstimmung des ausgehend vom Datenbankeintrag prognostizierten tRF-Muster mit dem in der Probe nachgewiesenen tRF-Mustern.

TReFID Ergebnisse für <i>Pseudomyrmex ferrugineus</i>				Durch “klassische” Methoden bestätigt	
Klassen	Ordnungen	Gattungen*	TReFID score**	PCR	Kultur
Acidobacteria	Acidobacteriales		100 %		
Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Actinomyces</i>	94 %	x	x
		<i>Corynebacterium</i>	100 %		
		<b><i>Curtobacterium</i></b>	<b>83 %</b>		
		<i>Mycobacterium</i>	94 %		
		<b><i>Streptomyces</i></b>	<b>100 %</b>		
	Bifidobacteriales	<i>Bifidobacterium</i> <i>Scardovia</i>	100 % 95 %		
	Coriobacteriales		100 %		
	Rubrobacterales		100 %		
$\alpha$ - Proteobacteria	Rhizobiales	<i>Afipia</i>	100 %		x
		<i>Azorhizobium</i>	100 %		
		<i>Bartonella</i>	100 %		
		<i>Bosea</i>	91 %		
		<i>Bradyrhizobium</i>	100 %		
		<i>Devosia</i>	95 %		
		<i>Ensifer</i>	100 %		
		<i>Fulvimarina</i>	95 %		
		<i>Hyphomicrobium</i>	91 %		
		<b><i>Mesorhizobium</i></b>	<b>93 %</b>		
		<i>Ochrobactrum</i>	100 %		
	Rhodobacterales	<i>Paracoccus</i>	95 %		
	Sphingomonadales		100 %		
	Rhodospirillales	<i>Acetobacter</i>	100 %		
		<i>Azospirillum</i>	90 %		
		<i>Stella</i>	100 %		
		<i>Swaminathania</i>	100 %		
	Caulobacteriales	<i>Brevundimonas</i>	100 %		
		<i>Caulobacter</i>	100 %		
		<i>Phenylobacterium</i>	90 %		
	Rickettsiales (bislang nicht	<i>Anaplasma</i>	95 %		
		<i>Neorickettsia</i>	89 %		

	(bislang nicht kultivierbar)	<i>Neorickettsia</i> <i>Rickettsia</i> <i>Wolbachia</i>	89 % 100 % 100 %		
<b>β-Proteobacteria</b>	<b>Burkholderiales</b>	<i>Achromobacter</i>	100 %	<b>x</b>	<b>x</b>
		<i>Acidovorax</i>	100 %		
		<i>Alicyciphilus</i>	93 %		
		<b><i>Burkholderia</i></b>	<b>100 %</b>		
		<i>Comamonas</i>	100 %		
		<b><i>Cupriavidus</i></b>	<b>100 %</b>		
		<i>Dechloromonas</i>	100 %		
		<i>Delftia</i>	100 %		
		<i>Herbaspirillum</i>	100 %		
		<i>Janthinobacterium</i>	100 %		
		<i>Limnobacter</i>	100 %		
		<i>Massilia</i>	100 %		
		<i>Pandoraea</i>	95 %		
		<b><i>Variovorax</i></b>	<b>88 %</b>		
	<b>Rhodocyclales</b>		100 %		
	<b>Neisseriales</b>	<i>Laribacter</i>	100 %		
<b>γ-Proteobacteria</b>	<b>Pseudomonadales</b>	<b><i>Acinetobacter</i></b>	<b>100 %</b>		<b>x</b>
		<i>Pseudomonas</i>	100 %		
	<b>Oceanospirillales</b>				
	<b>Xanthomonadales</b>	<i>Zooshikella</i>	100 %		
	<b>Enterobacteriales</b>	<i>Buchnera</i>	90 %	<b>x</b>	<b>x</b>
		<i>Buttiauxella</i>	100 %		
		<i>Citrobacter</i>	90 %		
		<i>Dickeya</i>	100 %		
		<i>Enterobacter</i>	91 %		
		<b><i>Erwinia</i></b>	<b>85 %</b>		
		<i>Morganella</i>	91 %		
		<b><i>Pantoea</i></b>	<b>91 %</b>		
		<b><i>Serratia</i></b>	<b>95 %</b>		
		<i>Shewanella</i>	100 %		
		<i>Sodalis</i>	86 %		
	<b>Alteromonadales</b>	<i>Alteromonas</i>	100 %		
		<i>Shewanella</i>	100 %		
	<b>Chromatiales</b>	<i>Allochrocatium</i>	100 %		
<b>δ-Proteobacteria</b>	<b>Aeromonadales</b>	<i>Anaerobiospirillum</i>	100 %		
	<b>Bdellovibrionales</b>	<i>Bdellovibrio</i>	100 %		
	<b>Desulfovibrionales</b>	<i>Bilophila</i>	100 %		
<b>Firmicutes</b>	<b>Bacillales</b>	<b><i>Bacillus</i></b>	<b>100 %</b>	<b>x</b>	<b>x</b>
		<i>Kurthia</i>	100 %		
		<i>Listeria</i>	100 %		
		<i>Paenibacillus</i>	100 %		
	<b>Lactobacillales</b>	<i>Enterococcus</i>	100 %	<b>x</b>	
		<i>Geobacillus</i>	95 %		
		<i>Lactobacillus</i>	100 %		
		<i>Leuconostoc</i>	100 %		
		<b><i>Streptococcus</i></b>	<b>100 %</b>		
		<i>Symbiobacterium</i>	89 %		

		<i>Weissella</i>	83 %	x	x
<b>Bacterioidetes</b>	<b>Bacteroidales</b>		100 %		
<b>Cyanobacteria</b>	<b>Family 1.1</b>		100 %		
	<b>Family 3.1</b>	<i>Arthrospira</i>	100 %		
		<i>Oscillatoria</i>	100 %		
	<b>Family 4.1</b>	<i>Nostoc</i>	100 %		
		<i>Aphanizomenon</i>	100 %		
		<i>Cylindrospermum</i>	100 %		
<b>Spirochaetes</b>	<b>Spirochartales</b>	<i>Borrelia</i>	100 %		
		<i>Brachyspira</i>	100 %		
		<i>Brevinema</i>	100 %		
		<i>Leptospira</i>	100 %		
		<i>Treponema</i>	100 %		

### 3.2.3.2 Bakterielle Diversität bei *Pseudomyrmex gracilis*

Es wurden die Arbeiterinnen und Larven (drittes Larvenstadium) von sieben Kolonien (in den Abbildungen als A1-A7 bzw. L1-L5, LD1, LD2) zur Analyse herangezogen. Für die Auswertung der sieben Analysen wurden insgesamt 2428 tRF-Muster, die von TReFID Datenbankeinträgen zugerechnet wurden, ausgewertet. Die aufgrund relativ schwacher Fluoreszenzsignale geringste Musterzahl wies die Analyse der Arbeiterinnen von Kolonie 3 (gracA3) mit nur 20 verschiedenen tRF-Mustern auf. Mit über 496 detektierten tRF-Mustern war die Analyse der Larven von Kolonie 7 jene Analyse mit den höchsten Anzahl unterschiedlicher tRF-Muster. Die durchschnittliche tRF-Musterzahl lag für die Arbeiterinnen bei 144 ( $\pm 92$ ) und für die Larven bei 222 ( $\pm 144$ ) Muster und damit weit hinter der bei *P. ferrugineus*-Proben von TReFID kalkulierten Musterzahl (Abbildung 3.4).

Wie bei *P. ferrugineus* ging ein Großteil der Muster auf Proteobakterien zurück.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien stellten den überwiegenden Teil dieser tRF-Muster (Abbildung 3.10). Die  $\beta$ -Proteobakterien waren jedoch auch in allen Analysen vertreten und wurden überwiegend durch Burkholderiales-spezifische Muster repräsentiert. Auf die genaue Zusammensetzung der Muster der Proteobacteria wird weiter unten eingegangen (siehe auch Tabelle 3.5).

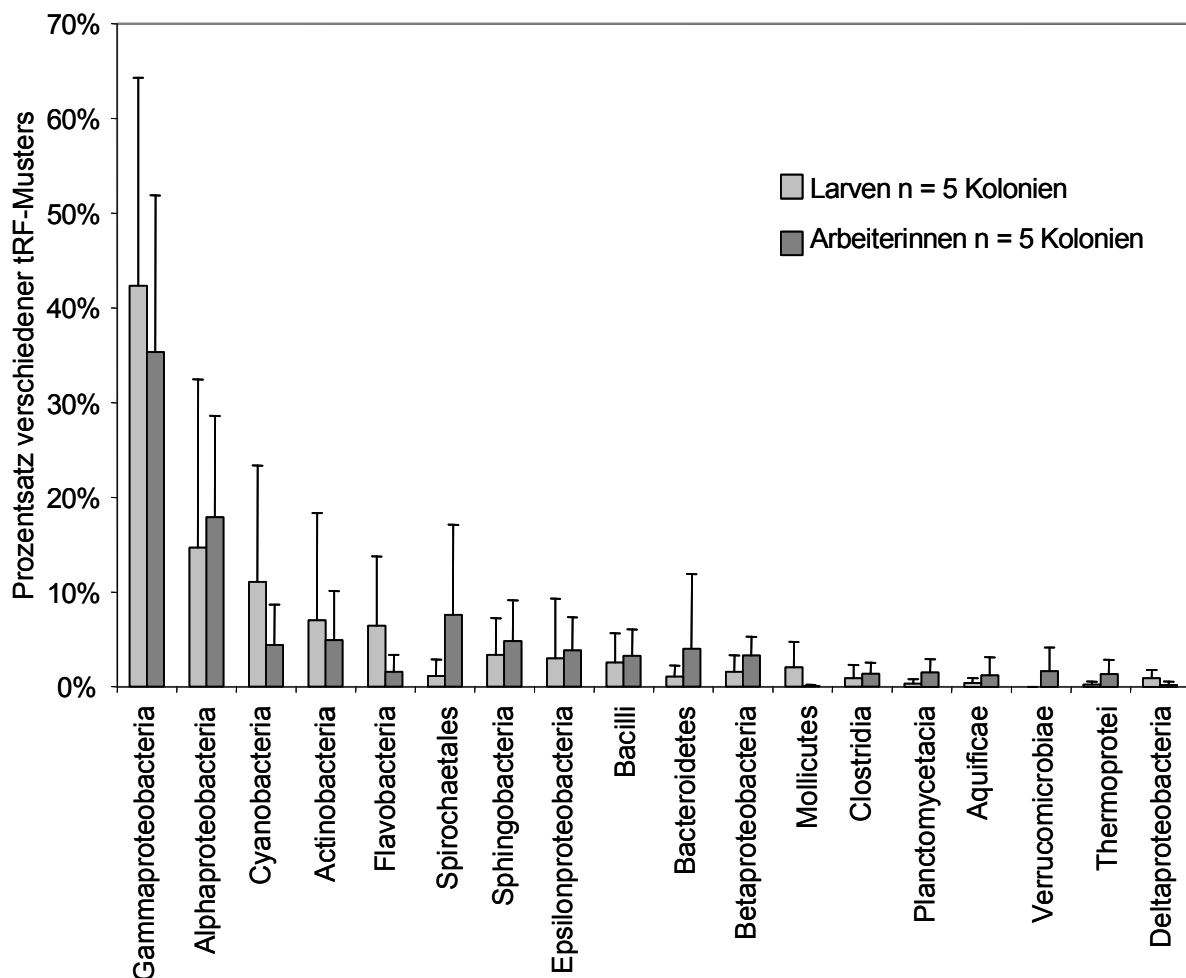
**Actinobacteria.** Durchschnittlich 6 % aller tRF-Muster konnten als spezifisch für die Division der grampositiven Actinobacteria identifiziert werden. Ein Großteil der Treffer in diesem Taxon schien auf Vertreter der Corynebacterineae: Nocardaceae zurückzuführen zu sein. Ausgehend von den Ergebnissen von TReFID waren die Gattungen *Streptomyces* und *Microbacterium* ebenfalls in der Probe vertreten.

**Spirochaetes.** Im Mittel 4 % der Muster ließen sich auf diese Gruppe zurückführen. Fast alle tRF-Muster deuteten wie bei *P. ferrugineus* auf die Gegenwart von *Leptospira* (Leptospiraceae) und *Treponema* (Spirochaetaceae).



**Sphingobacteria.** Ebenfalls mit 4 % der tRF-Muster an der Gesamtdiversität vertreten war die Klasse der Sphingobacteria.

**Flavobacteria.** Mit durchschnittlich 4 % der tRF-Muster waren die Flavobakterien in den Analysen von *P. gracilis* vertreten. Dabei wiesen die Muster größtenteils auf *Tenacibaculum* hin, dessen prognostiziertes tRF-Muster zu 100 % mit dem tatsächlichen Muster der Proben übereinstimmte.



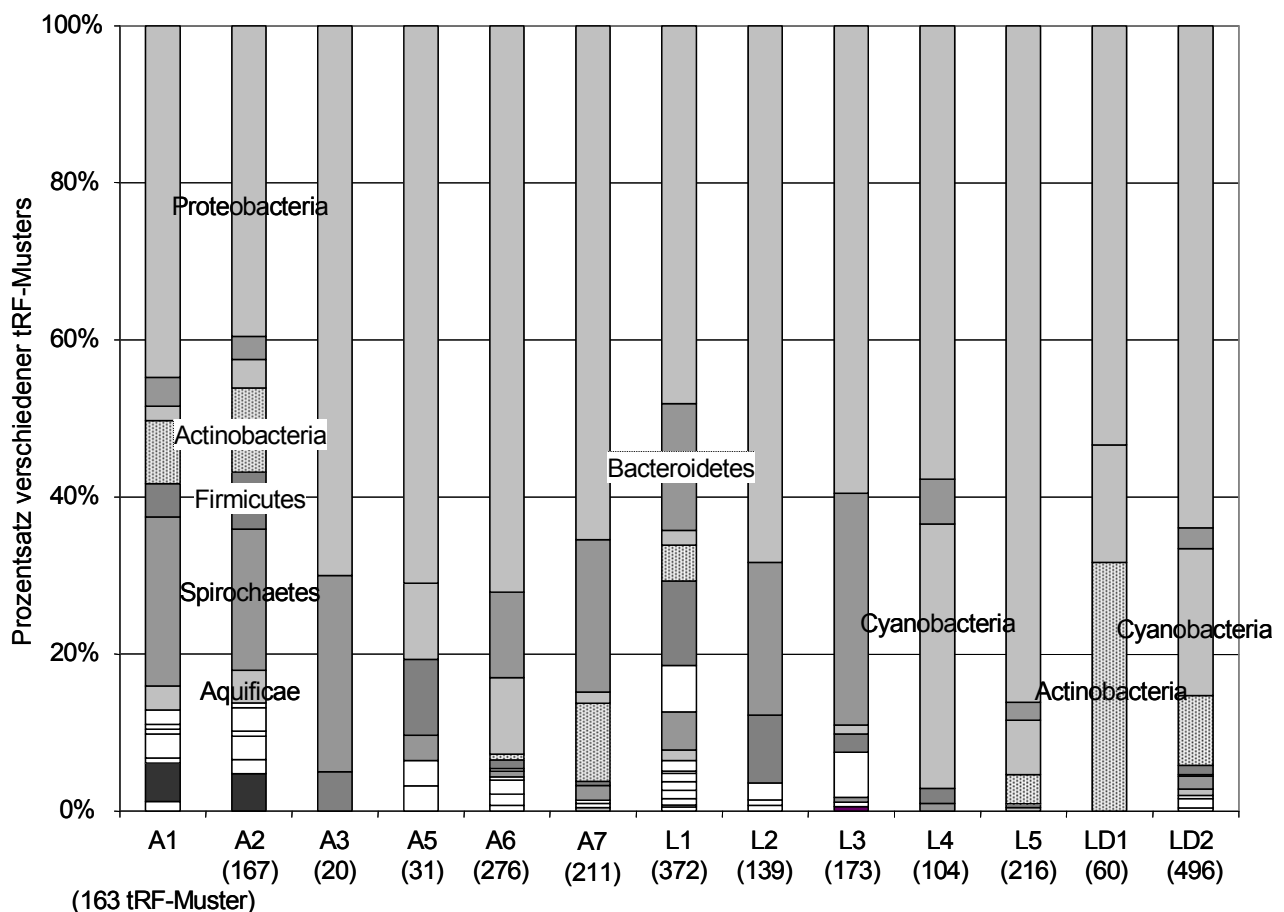
**Abbildung 3.10: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

Diversität der Bakteriengemeinschaft assoziiert mit *P. gracilis*. Diese Analyse basiert auf der Auswertung von insgesamt 2.428 tRF-Mustern (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“). Das Maß der Diversität eines jeden Taxon wurde dabei relativ zur Anzahl aller detektierten tRF-Muster für jede einzelne Analyse gesetzt. Für die Larven wie Arbeiterinnen dienten fünf Kolonien als Grundlage. Signifikante statistische Unterschiede der bakteriellen Diversität zwischen Larven und Arbeiterinnen ergaben konnten nicht nachgewiesen werden (Statistische Untersuchung mit Statistica 6 (*StatSoft*); Mann-Whitney U Test).

**Cyanobacteria.** Mit 8 % trugen die Cyanobakterien auch bei *P. gracilis* einen erheblichen Anteil an der Gesamtdiversität der tRF-Muster. Die Datenbankeinträge, deren prognostizierte Muster zu denen aus den Ameisenproben passen, wurden vom *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) überwiegend den Familien I und XIII zugerechnet. Hohe Übereinstimmungen gab es mit nicht kultivierten Cyanobakterien, die zur Gattung *Synechococcus* gezählt wurden.

**Bacteroidetes** (ausgenommen Sphingobacteria und Flavobacteria). Im Schnitt 2 % der tRF-Muster deuteten auf die Gegenwart dieser Gruppe. Eine genauere Zuordnung war nicht möglich.

**Bacilli.** 2,8 % der Muster wiesen auf diese Gruppe hin. Die Trefferwerte waren jedoch relativ gering (um 75 % Übereinstimmung).



**Abbildung 3.11: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Divisionen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

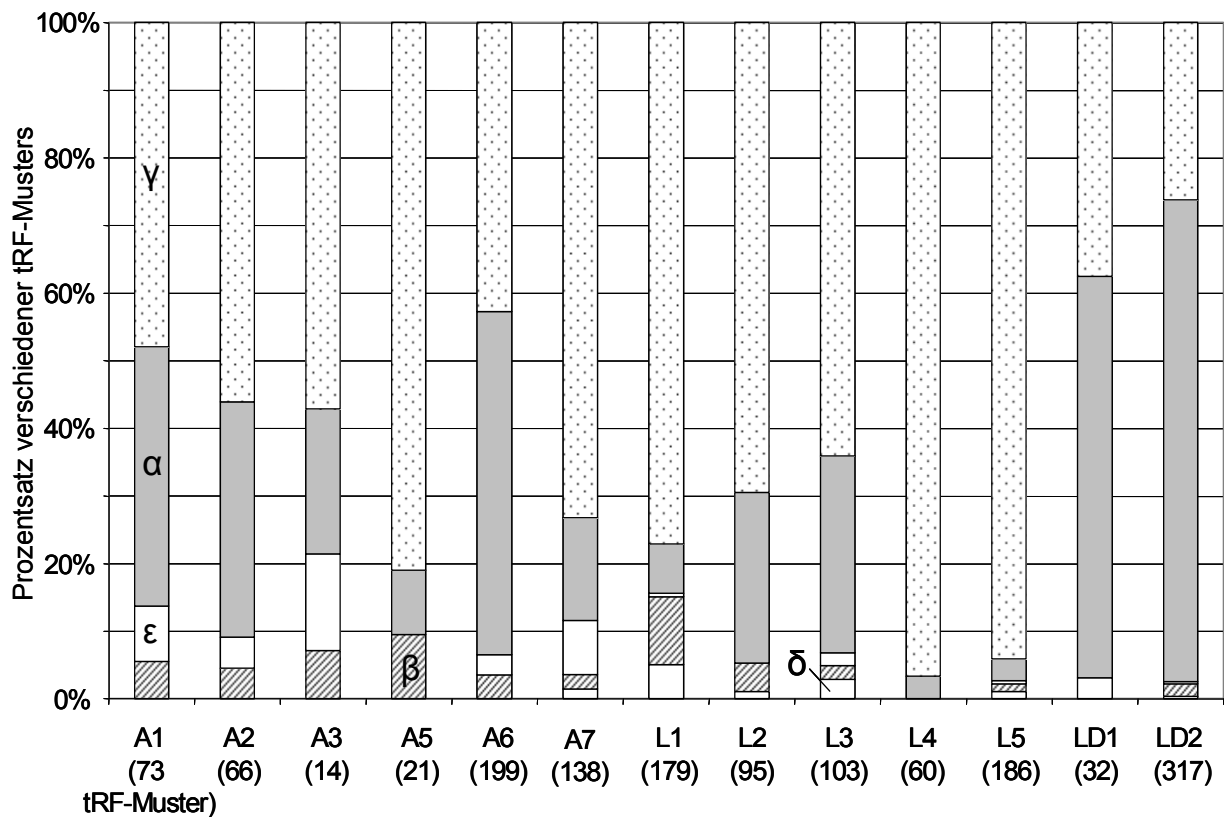
Diversität der Bakterien (Divisionen) assoziiert mit *P. gracilis*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien A1 –A7, L1-L5 und LD1 sowie LD2 (A = Arbeiterinnen; L = Larven) jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Anzahl der tRF-Muster in Klammern. Wie bei *P. ferrugineus* stellen auch hier

die Proteobakterien einen erheblichen Anteil an der Gesamtdiversität der tRF-Muster (insgesamt 2.428 tRF-Mustern ausgewertet; terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“).

### Proteobacteria.

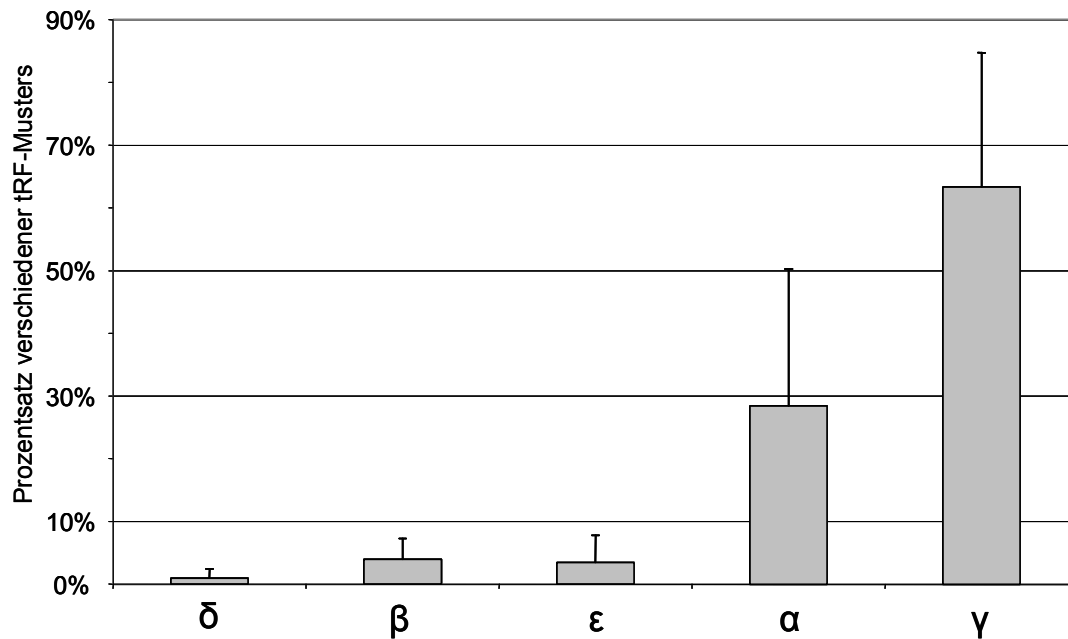
Im Mittel über 57 % aller detektierten tRF-Muster ließen sich den drei großen Proteobakteriengruppen der Proben ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Proteobacteria) zuordnen. Wie bei *P. ferrugineus* stellten die Proteobakterien damit die diverseste Gruppe der Untersuchung dar (Abbildung 3.10 und 3.11).

**$\alpha$ -Proteobakterien.** 16 % der tRF-Muster wurden von TReFID auf die Gegenwart von  $\alpha$ -Proteobakterien zurückgeführt. An diesen tRF-Mustern nahmen die Rhizobiales mit 39 % den größten Anteil, gefolgt von den Sphingomonadales mit 37 %. Daneben schienen auch noch



**Abbildung 3.12: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

Übersicht über die Zusammensetzung der tRF-Muster (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“) der Proteobakterien in Larven und Arbeiterinnen von *P. gracilis*. Es dominieren Muster der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria (1.483 tRF-Muster ausgewertet; A = Arbeiterinnen; L = Larven).

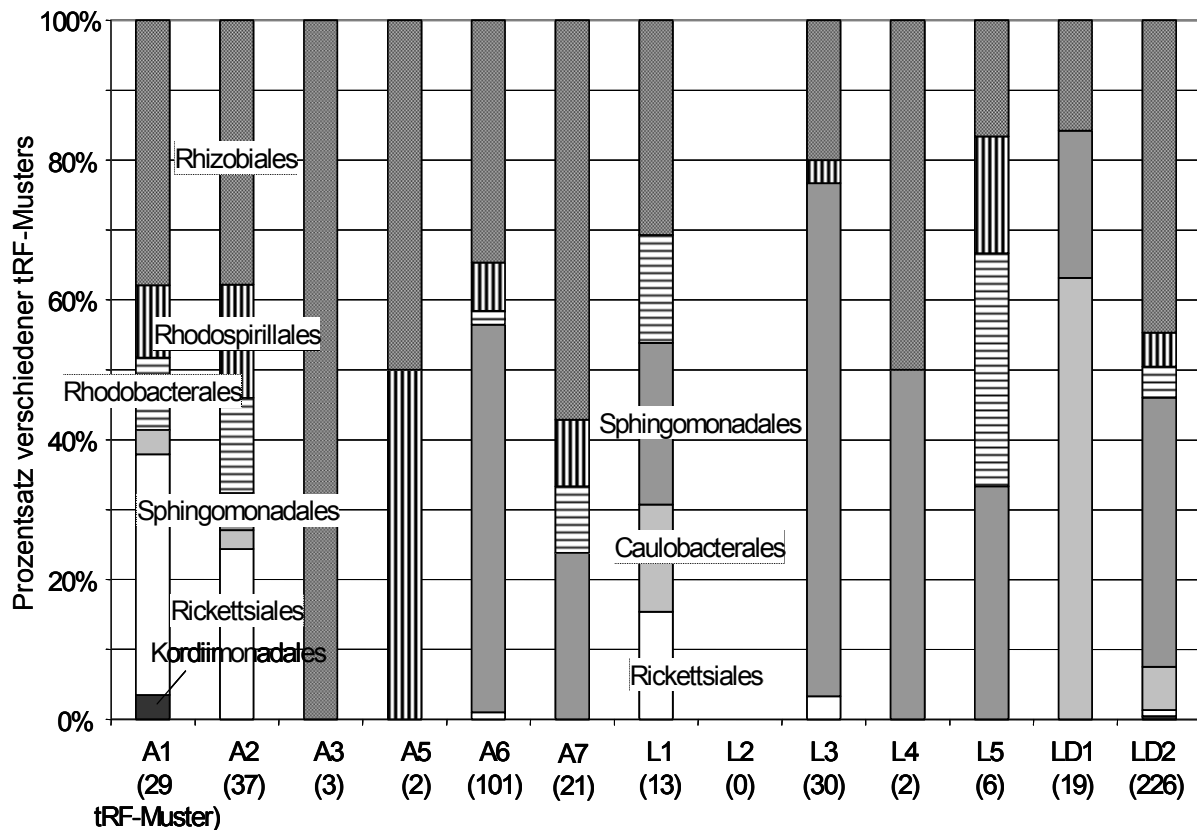


**Abbildung 3.13: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster der Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

Übersicht über die Zusammensetzung der tRF-Muster (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“) der Proteobakterien assoziiert mit der Ameise *P. gracilis*. Es dominieren Muster der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria (1.483 tRF-Muster ausgewertet; A = Arbeiterinnen; L = Larven).

Vertreter anderer Ordnungen der  $\alpha$ -Proteobakterien vertreten zu sein – allerdings mit nur geringer Unterstützung (relativ geringen Übereinstimmung der tRF-Muster der Datenbank mit der Probe). Siehe hierzu Abbildung 3.14.

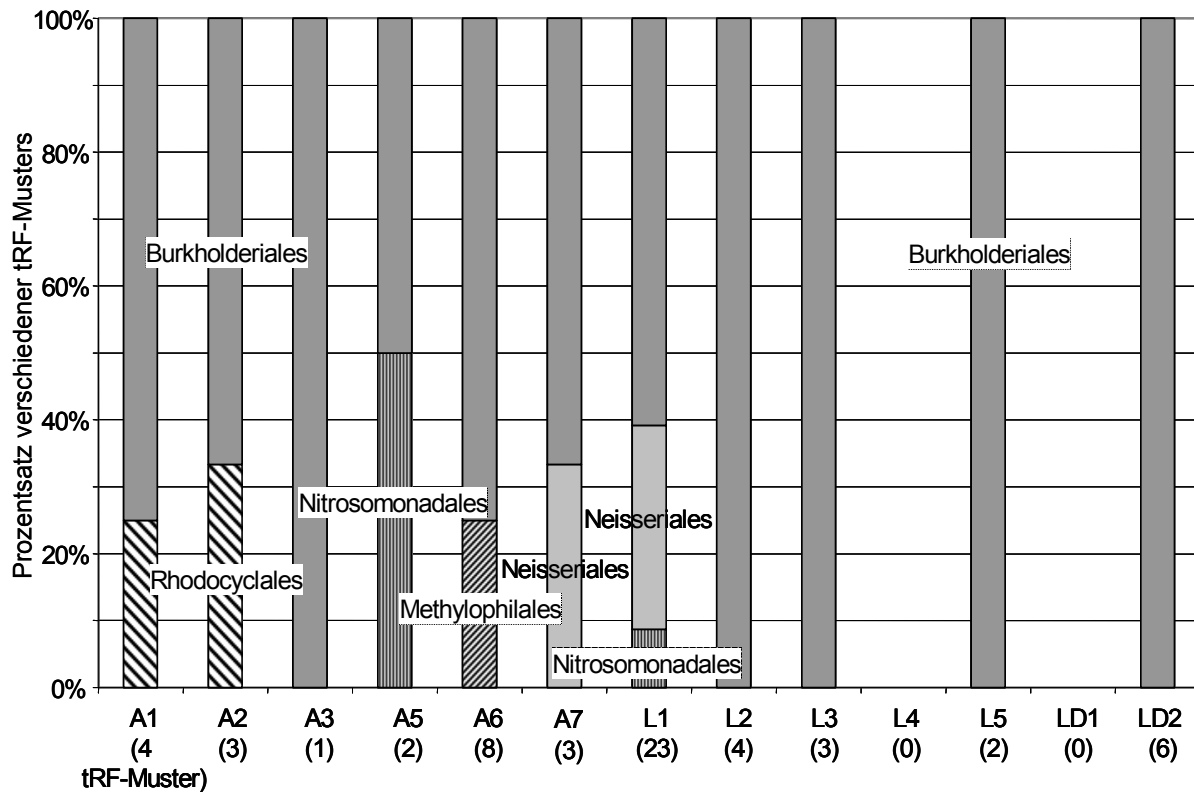
**β-Proteobakterien.** 2,3 % der tRF-Muster deuteten auf die Klasse der β-Proteobakterien hin. Über 70 % dieser Muster wiesen auf die Gegenwart von Burkholderiales in den Proben hin (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.14: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller  $\alpha$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

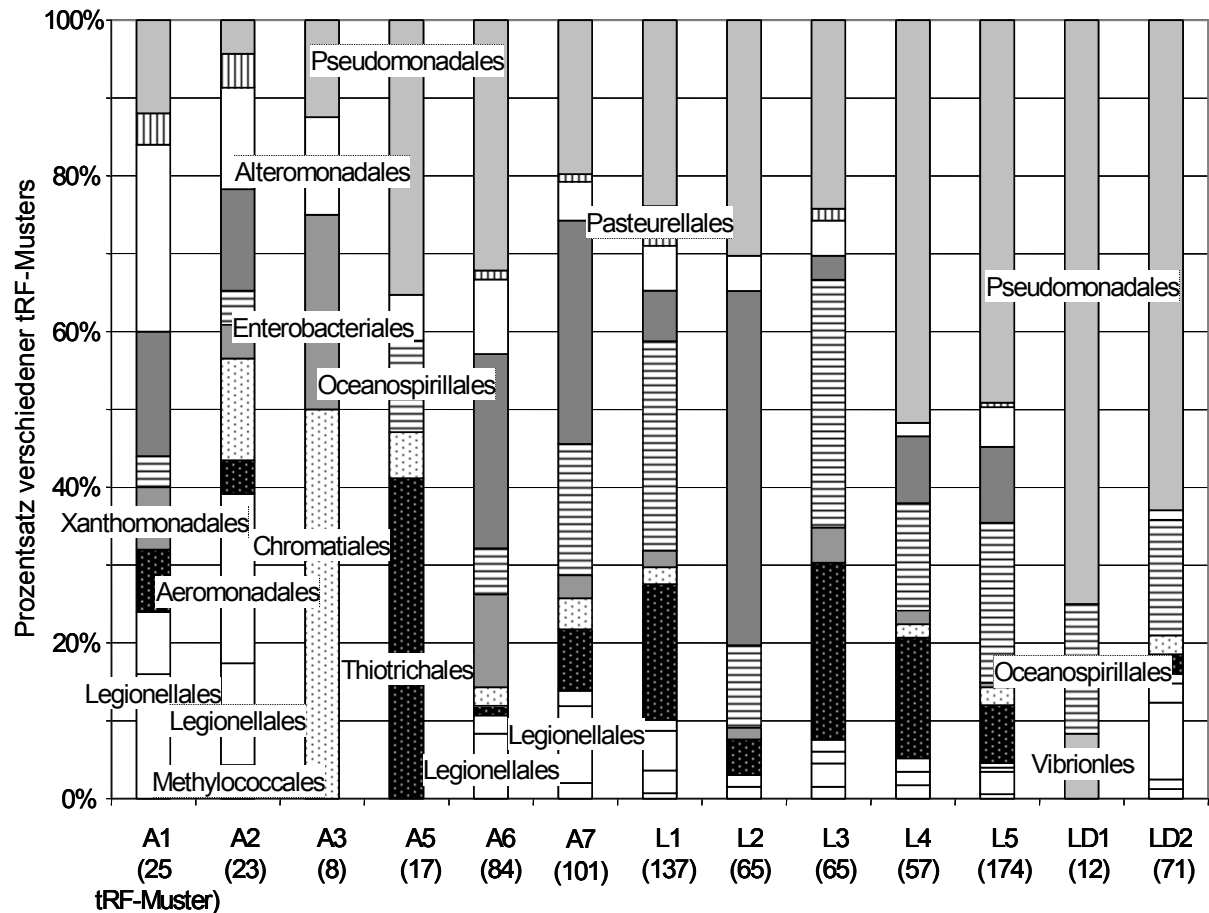
Diversität der  $\alpha$ -Proteobakterien in *P. gracilis*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Anzahl der tRF-Muster. Die Ordnung Rhizobiales ist in allen Kolonien vertreten (außer L2: aber Larven von A2). Auch hier gibt es wieder vereinzelt Hinweise auf eine Infektion mit Vertretern der Ordnung Rickettsiales. (A = Arbeiterinnen; L = Larven)

**$\gamma$ -Proteobakterien.** Die Division der  $\gamma$ -Proteobakterien vereinte auf sich mit ca. 39 % in allen Proben den größten Teil der tRF-Muster. Von diesen Mustern ließen sich im Durchschnitt 35 % auf die Pseudomonadales (vertreten durch Pseudomonadaceae und Moraxellaceae) gefolgt von 14 % Enterobacteriales (vertreten durch Enterobacteriaceae) zurückführen. Mit kleineren Prozentsätzen waren noch folgende Taxa vertreten: Alteromonadales, Pasteurellales, Methylococcales, Legionellales, Aeromonadales, Thiotrichales, Chromatiales, Xanthomonadales und Oceanospirillales. Klassen wie Acidobacteria, Clostridia,  $\delta$ -Proteobacteria, Planctomycetacia und Thermoprotei waren nur mit wenigen detektierten Mustern in allen Analysen vertreten (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.15: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller  $\beta$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

Diversität der  $\beta$ -Proteobakterien in *P. gracilis*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Zahl der tRF-Muster. Die tRF-Muster weisen stark auf die Präsenz von Bakterien der Ordnung Burkholderiales hin (außer L4 und LD1). (A = Arbeiterinnen; L = Larven)



**Abbildung 3.16: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller  $\gamma$ -Proteobacteria aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex gracilis*.**

Diversität der  $\gamma$ -Proteobakterien in *P. gracilis*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien jeweils für Larven und Arbeiterinnen mit Angabe der absoluten Zahl der tRF-Muster. In fast allen Kolonien sind Pseudomonadales, Alteromonadales, Enterobacteriales und Xanthomonadales nachweisbar. Zudem gibt es häufiger tRF-Muster die auf Thiotrichales hinweisen. (A = Arbeiterinnen; L = Larven)

**Tabelle 3.5: TReFID - Beste Treffer *Pseudomyrmex gracilis***

\*) score-Werte = von 90 bis 100 % Übereinstimmung der prognostizierten tRF-Muster für bekannte Bakterien mit tRF-Mustern in der Probe *P. gracilis* analysiert mit TReFID. Identifikation der Referenzsequenz mit \*\*) *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Referenzen zu den Bemerkungen: (Ohkuma *et al.* 1999a, Droge *et al.* 2008, Droge *et al.* 2006).

Systematik	Vermutliche Gattung	TReFID-score*	Ribosomal Classifier-value**	Bemerkung
Bacteroidetes Flavobacteria Oder Sphingobacteria	<i>Tenacibaculum</i>	100 %	100 %	Darmflora vieler Tiere z. B. auch von Termiten
Spirochaetes Spirochaetes Spirochaetales Leptospiraceae	<i>Leptospira</i>	94 %	100 %	Darmflora vieler Tiere z. B. auch von Termiten
$\alpha$ -Proteobacteria Sphingomonadales Sphingomonadaceae	<i>Sphingopyxis</i> <i>Sphingomonas</i>	94 % 96 %	100 % 100 %	
$\gamma$ -Proteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae		90 % - 100 %	100 %	Darmflora vieler Tiere z. B. auch von Termiten
$\gamma$ -Proteobacteria Cardiobacteriales Cardiobacteriaceae	<i>Cardiobacterium</i>	90 %	100 %	
Unbestimmte $\alpha$ -Proteobacteria		100 %		
Unbestimmte $\gamma$ -Proteobacteria		100 %		



### 3.2.3.3 Bakterielle Diversität bei *Pseudomyrmex salvini*

Es konnten die Arbeiterinnen und Larven (drittes Larvenstadium) von zwei Kolonien zur Analyse verwandt werden. Die eine Kolonie wird seit November 2007 im Labor kultiviert (in den Abbildungen als AA, AL = Laborkolonie Arbeiterinnen und Larven). Bei der anderen Probe handelte es sich um August 2007 im Feld gesammelte Präparate (Kolonie 322 = Präparate einer in Mexiko besammelten Kolonie, die in Ethanol konserviert waren). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Proben in jeweils zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen und Analysen untersucht. Es lagen also insgesamt sechs Analysen vor: Zwei von Arbeiterinnen der Laborkolonie, zwei von den Larven der Laborkolonie und zwei weitere, die auf Arbeiterinnen die besammelte Kolonie mit der laufenden Nummer 322 zurückzuführen war. Für die Auswertung der Analysen wurden über 2761 tRF-Muster, die von TReFID Datenbankeinträgen zugerechnet wurden, ausgewertet. Die Musterzahl der insgesamt sechs Analysen lag bei durchschnittlich 460 Mustern und schwankte zwischen maximal 732 und minimal 205 tRF-Mustern.

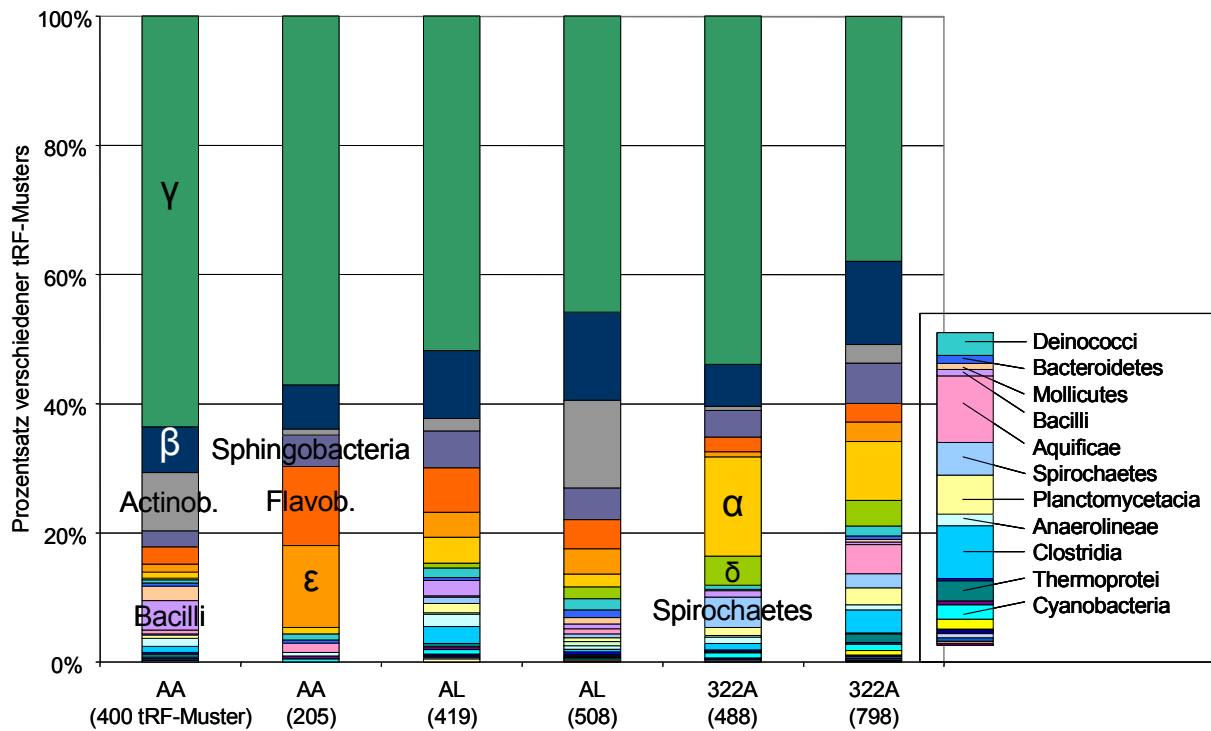
Ein Großteil der tRF-Muster ging auf Proteobakterien zurück.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien stellten den überwiegenden Teil dieser tRF-Muster (Abbildung 3.17 und 3.18). Die  $\beta$ -Proteobakterien waren jedoch auch in allen Analysen vertreten und wurden überwiegend durch Burkholderiales-spezifische Muster repräsentiert. Auf die genaue Zusammensetzung der Muster der Proteobacteria wird weiter unten eingegangen.

**Actinobacteria.** Durchschnittlich knapp 5 % aller tRF-Muster konnten dieser Klasse zugeordnet werden. Aus der Gruppe der Actinomycetales hatte das Taxon Frankineae die größte Übereinstimmung zwischen Datenbankeintrag und Umweltprobe. Diese Gruppe (Frankineae) war bei *P. ferrugineus* und *P. gracilis* nicht nachzuweisen.

**Spirochaetes.** Etwa 1,4 % der tRF-Muster deuteten auf die Präsenz der Spirochaeten. Alle detektieren Muster ließen sich auf die Gattungen *Treponema* und *Leptospira* zurückführen.

**Sphingobacteria.** 4,7 % der tRF-Muster erwiesen sich als spezifisch für diese Klasse der Bacteroidetes. Die Übereinstimmung der tRF-Muster für die Gattung *Sphingobacterium* mit war relativ hoch. Daneben schienen aber auch andere nicht näher bestimmbare Bakterien dieser Klasse in den Proben enthalten zu sein.

**Flavobacteria.** Im Mittel 5 % der Muster konnten den Flavobakterien zugeschrieben werden. Der überwiegende Anteil der Muster ließ sich dabei auf die Gegenwart eines Vertreters der Gattung *Tenacibaculum* zurückführen.



**Abbildung 3.17: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster aller Divisionen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex salvini*.**

Diversität der Bakterien (Klassen) assoziiert mit *P. salvini*. Vergleich des prozentualen Anteils der verschiedenen Ordnungen in den untersuchten Kolonien AA (Arbeiterinnen der Laborkolonie), AL (Larven der Laborkolonie) sowie 322A (Arbeiterinnen der Kolonie 322 gesammelt in Los Tuxtlas) mit Angabe der absoluten Anzahl der tRF-Muster in Klammern (jeweils 2 Analysen, also 2 x 3). Wie bei *P. ferrugineus* und *P. gracilis* stellen auch hier die Proteobakterien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) einen erheblichen Anteil an der Gesamtdiversität der tRF-Muster (insgesamt 2.818 tRF-Mustern ausgewertet; terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“).

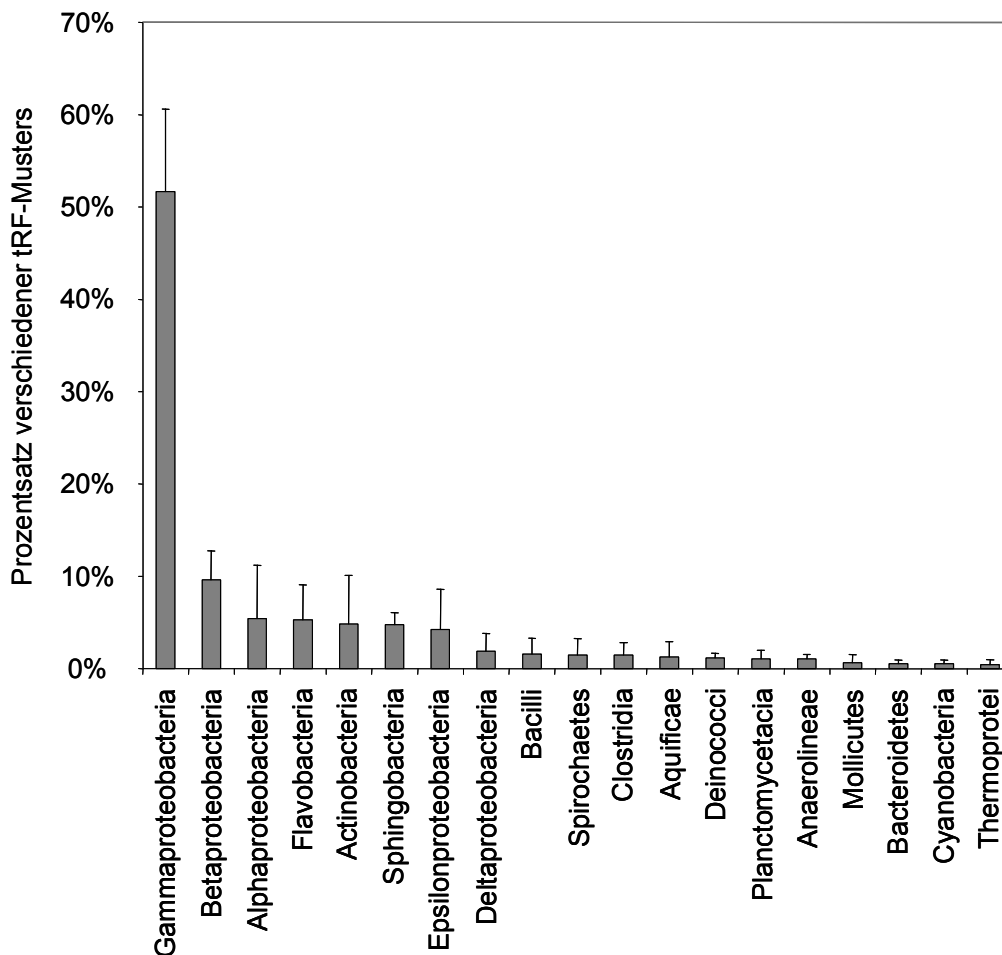
**Bacilli.** 1,5 % der tRF-Muster ließen sich den Bacilli zuordnen. Die Gruppe schien nach Auswertung der Trefferlisten durch Vertreter der Gattungen *Streptococcus* (Lactobacillales; Streptococcaceae) und *Bacillus* (Bacillaceae 1) in *P. salvini* vertreten zu sein.

#### **Proteobacteria.**

65 % aller hier detektieren tRF-Muster konnten den Proteobakteriengruppen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zugerechnet werden. Von diesen machten 51 % alleine  $\gamma$ -Proteobacteria aus.

**$\alpha$ -Proteobakterien.** Mit durchschnittlich 5 % der tRF-Muster war die Anzahl der tRF-Muster für diese Gruppe bei *P. salvini* im Vergleich zu den anderen beiden Ameisenarten sehr niedrig. Die Rhizobiales stellen den größten Anteil dieser tRF-Muster. Nur schwach vertreten sind Caulobacterales, Rhodobacterales und Rhodospirillales.

**$\beta$ -Proteobakterien.** Mit einem Mittelwert von 9,5 % der sechs Analysen erwiesen sich bei *P. salvini* die  $\beta$ -Proteobacteria als die zweit diverseste Gruppe bezogen auf tRF-Muster. Die Muster deuteten darauf hin, dass diese Gruppe mit Vertretern der Ordnungen Neisseriales, Nitrosomonadales und Burkholderiales (*Burkholderia*) in den Ameisen vertreten waren.



**Abbildung 3.18: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex salvini*.**

Diversität der Bakteriengemeinschaft assoziiert mit *P. salvini*. Diese Analyse basiert auf der Auswertung von insgesamt 2.818 tRF-Mustern (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“). Das Maß der Diversität eines jeden Taxon wurde dabei relativ zur Anzahl aller detektierten tRF-Muster für jede einzelne Analyse gesetzt. Wegen der geringen Probenzahl (zwei Kolonien und insgesamt sechs Analysen) wurden die Werte für die Larven und die Arbeiterinnen zusammengefasst und der Durchschnitt ermittelt. Über 50 % aller tRF-Muster ließen sich auf Proteobakterien zurückführen, von denen die  $\gamma$ -Proteobakterien den größten Anteil ausmachten.

**$\gamma$ -Proteobakterien.** Diese Division vereinte auf sich in allein durchschnittlich 51 % aller von TReFID in den Proben detektierten tRF-Muster. Diese verteilen sich wie folgt: 50 % Pseudomonadales (Pseudomonadaceae: *Pseudomonas*), 20 % Oceanospirillales (die meisten

Datenbanksequenzen, die in der Trefferliste bei dieser Gruppe erschienen, ließen sich vom Ribosomal Database Project II nicht näher bestimmen – *uncultured gamma proteobacterium*), 3,4 % Enterobacteriales (Enterobacteriaceae: *Serratia*), 4,6 % Xanthomonadales (Xanthomonadaceae: *Pseudoxanthomonas*), 8 % Chromatiales (auch hier: die meisten Datenbanksequenzen, die in der Trefferliste bei dieser Gruppe erschienen, ließen sich vom

**Tabelle 3.6: TReFID - Beste Treffer *Pseudomyrmex salvini***

\*) score-Werte = von 90 bis 100 % Übereinstimmung der prognostizierten tRF-Muster für bekannte Bakterien mit tRF-Mustern in der Probe *P. salvini* analysiert mit TReFID). Identifikation der Referenzsequenz mit \*\*) *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Referenzen zu Bemerkungen: *Burkholderia* (Van Borm *et al.* 2002b).

Systematik	Vermutliche Gattung	TReFID-score*	Ribosomal Classifier-value**	Bemerkung
Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	91 %	100 %	
$\gamma$ -Proteobacteria Pseudomonadales Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	92 % - 100 %	100 %	
$\gamma$ -Proteobacteria Alteromonadales Pseudoalteromonadaceae	<i>Pseudoalteromonas</i>	91 % - 94 %	100 %	
$\gamma$ -Proteobacteria Alteromonadales Incertae sedis 7	<i>Marinobacter</i>	90 %	100 %	
$\gamma$ -Proteobacteria Xanthomonadales Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	90 %	100 %	
Bacteroidetes Flavobacteria Flavobacteriales Flavobacteriaceae	<i>Tenacibaculum</i>	100 %	100 %	
Deinococcus-Thermus Deinococci Thermales Thermaceae	<i>Thermus</i>	93 % - 94 %	100 %	
$\beta$ -Proteobacteria Burkholderiales Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	96 %	94 %	Von <i>Acromyrmex</i> bekannt
Unbestimmte $\alpha$ -Proteobacteria		100 %		
Unbestimmte $\gamma$ -Proteobacteria Enterobacteriales		100 %		

*Ribosomal Database Project II* nicht näher bestimmen – *uncultured gamma proteobacterium*), 7,3 % Alteromonadales (Pseudoalteromonadaceae: *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*), 2,5 % Thiotrichales (Piscirickettsiaceae, *Methylophaga*).

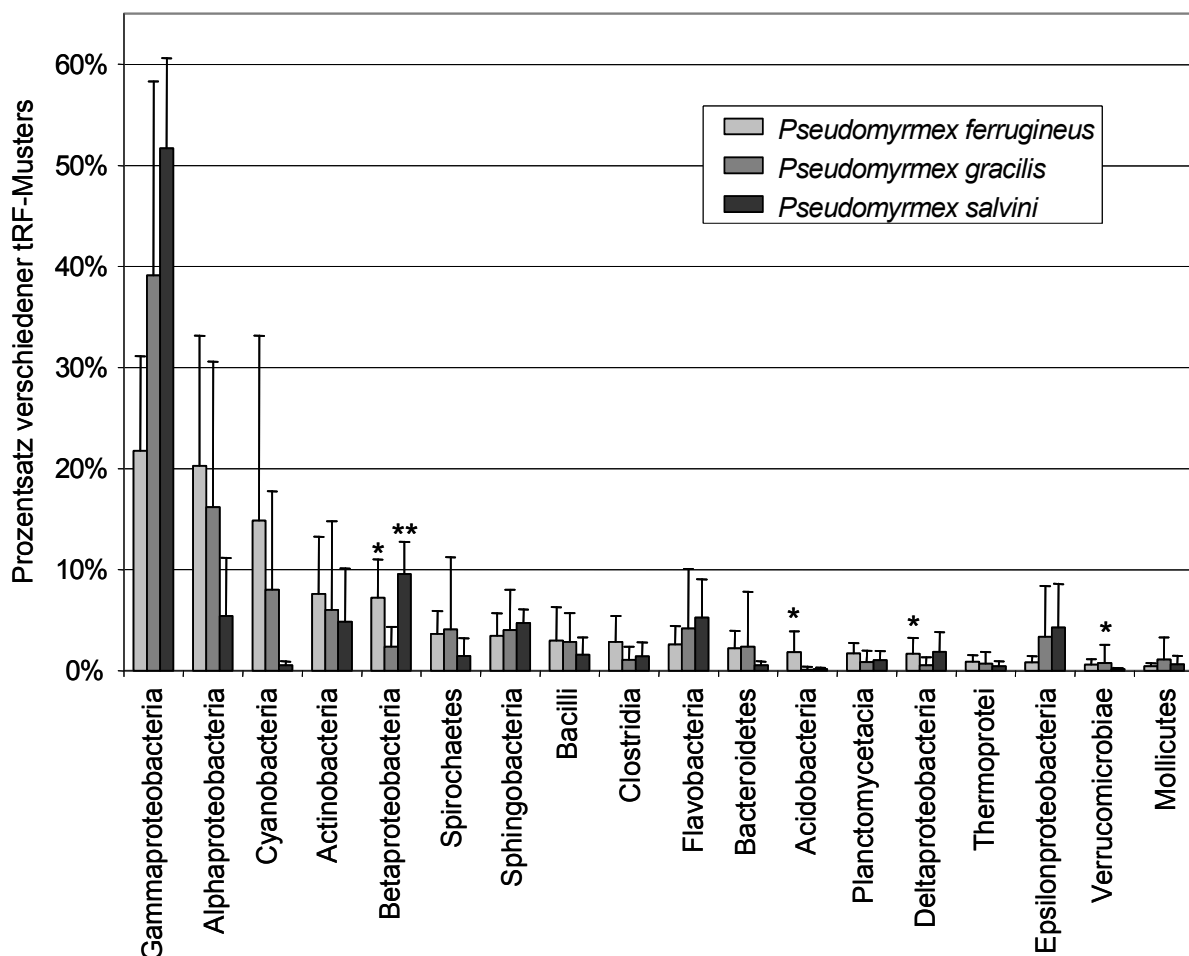
**ε-Proteobacteria.** Mit 4,2 % der tRF-Muster traten die ε-Proteobakterien bei *P. salvini* viel stärker auf, als bei den TReFID-Analysen der anderen beiden Ameisenarten. Die tRF-Muster schienen hier vor allem auf das Auftreten von *Sulfurovum* (Campylobacterales, Helicobacteraceae; ein chemoautotrophes Schwefelbakterium) und *Campylobacter* (Campylobacterales, Campylobacteraceae) in der Probe hinzudeuten.

**δ-Proteobacteria.** Mit 1,8 % der tRF-Muster erwies sich diese Gruppe der Proteobacteria, als jene mit der geringsten Diversität verschiedener tRF-Muster in den Proben. Die meisten Datenbanksequenzen, die in der Trefferliste bei dieser Gruppe erschienen, ließen sich vom *Ribosomal Database Project II* nicht näher bestimmen – *uncultured gamma proteobacterium*.

### 3.2.4 Vergleich der Bakteriengemeinschaften der Ameisenarten

Bei den unterschiedlichen Analysen der drei verschiedenen *Pseudomyrmex*-Arten durch TReFID wurden sehr unterschiedliche durchschnittliche tRF-Musterzahlen kalkuliert (Abbildung 3.4), was auf Unterschiede in der Diversität der Bakteriengemeinschaften der Ameisenarten hindeutet. Berechnet man jedoch die prozentualen Anteilsverhältnisse der für jedes Taxon spezifischen tRF-Muster bezogen auf die Gesamtanzahl aller Muster jeder Einzelanalyse, ergeben sich große Übereinstimmungen in der relativen Zusammensetzung der mit den drei untersuchten Ameisen assoziierten Bakteriengemeinschaften (Abbildung 3.19). Wie aus Abbildung 3.19 ersichtlich, sind γ- und α-Proteobacteria, Cyanobacteria, Actinobacteria, β-Proteobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria, Bacteroidetes und ε-Proteobacteria jene Gruppen, die mit über 90 % der tRF-Muster den größten Anteil der Bakteriendiversität bei allen drei Ameisenarten stellen. Signifikante Unterschiede im Anteilsverhältnis einzelner Gruppen ließen sich für die β-Proteobacteria und im geringeren Maße für Acidobacteria, δ-Proteobacteria und Verrucomicrobiae ermitteln [Statistische Untersuchung mit Statistica 6 (*StatSoft*); Mann-Whitney U Test für β- ( $p = 0,005$ ), δ-Proteobacteria ( $p = 0,009611$ ), Acidobacteria ( $p = 0,0047$ ) und Verrucomicrobia;  $p = 0,029$ ) ( $p < 0,05$ ;  $** < 0,001$ ;  $*** < 0,0001$ )]. Tendenziell nehmen die γ-Proteobacteria bei *P. gracilis* und besonders bei *P. salvini* mit Abstand den größten Anteil der tRF-Muster ein, wogegen bei *P. ferrugineus* die α-Proteobacteria anteilmäßig im Durchschnitt mit den γ-Proteobacteria gleich auf liegen. Abbildung 3.20 illustriert die tRF-Musterzusammensetzung der drei wichtigsten Proteobakteriengruppen γ, α und β im Vergleich von *P. ferrugineus*, *P. gracilis* und *P. salvini*. Die Kreisdiagramme gehen

auf die Durchschnittswerte aller Analysen für die jeweilige Art zurück. Die Ordnungen Oceanospirillales, Enterobacteriales, Alteromonadales und Pseudomonadales erwiesen sich bei dieser Betrachtung bei allen Ameisenarten ohne große Unterschiede als die diversesten Ordnungen innerhalb der Klasse  $\gamma$ -Proteobacteria. Auch bei der Zusammensetzung der tRF-Muster bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobakterien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *P. gracilis* und *P. ferrugineus* ermittelt werden. Auf eine Darstellung der Werte für die beiden letzt genannten Gruppen bei *P. salvini* musste aufgrund sehr weniger und daher nicht aussagekräftiger tRF-Musterzahlen hier verzichtet werden.



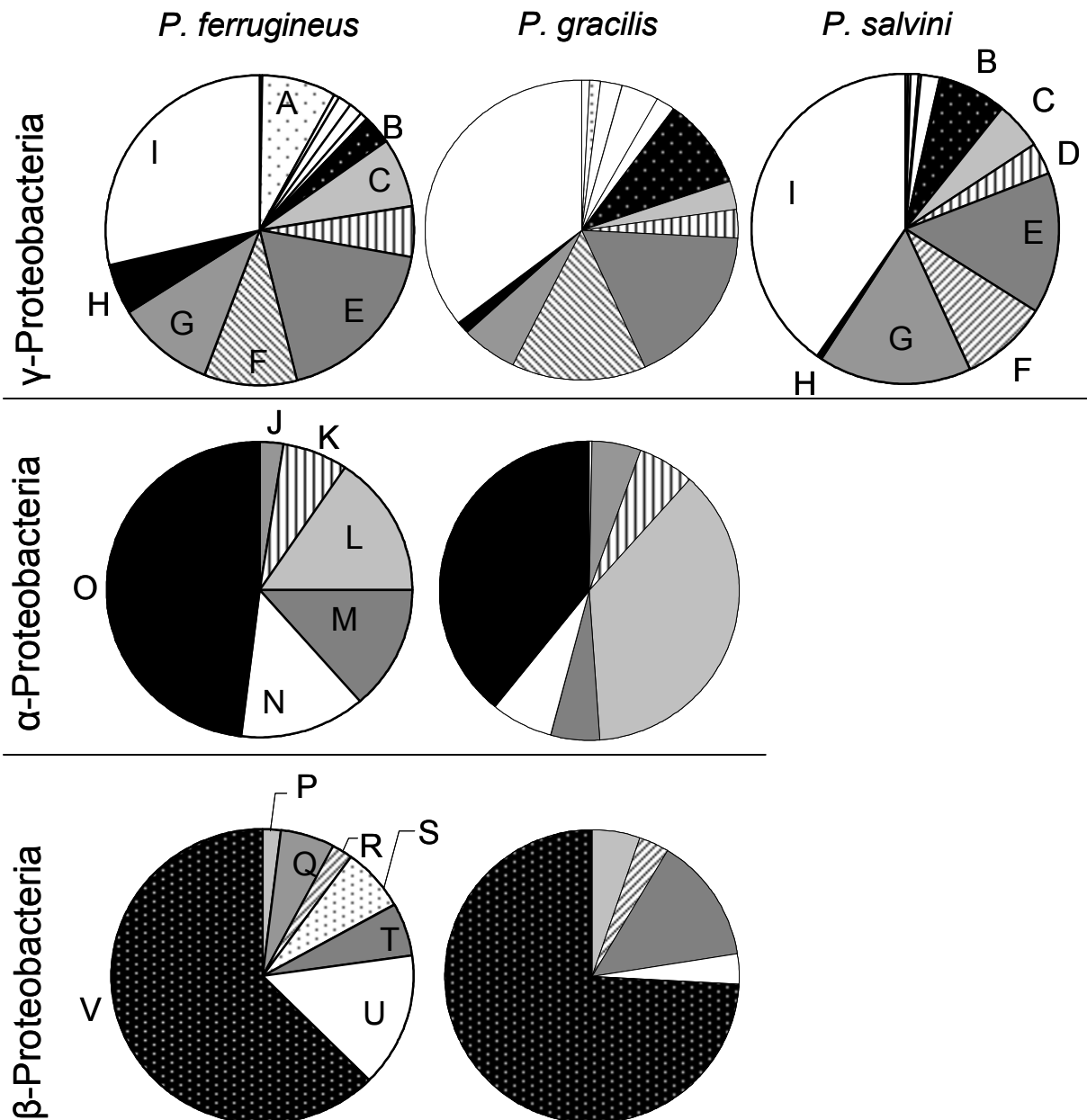
**Abbildung 3.19: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus*, *P. gracilis* und *P. salvini* im Vergleich.**

Vergleich der Prokaryoten-Diversitätsprofile von *P. ferrugineus* mit *P. gracilis* und *P. salvini*. Die Betaproteobacteria machten bei *P. salvini* signifikant mehr tRF-Muster aus als bei den anderen beiden Arten. Weiter Unterschiede erwiesen sich als nur schwachsignifikant. Statistische Untersuchung mit Statistica 6 (StatSoft); Mann-Whitney U Test für  $\beta$ - ( $p = 0,004988$ ),  $\delta$ -Proteobacteria ( $p = 0,009611$ ), Acidobacteria ( $p = 0,004675$ ) und Verrucomicrobia ( $p = 0,029357$ ) ( $p < 0,05$ ;  $** < 0,001$ ;  $*** < 0,0001$ ).

**Wertetabelle zu Abbildung 3.19:** Durchschnittliche prozentuale Anteile der verschiedenen Prokaryotenklassen an der Gesamtzahl der tRF-Muster.

Klassen	<i>P. ferrugineus</i>	<i>P. gracilis</i>	<i>P. salvini</i>
<b><math>\gamma</math>-Proteobacteria</b>	21,8 %	39,1 %	51,7 %
<b><math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>	20,3 %	16,2 %	5,4 %
<b>Cyanobacteria</b>	14,8 %	8,0 %	0,5 %
<b>Actinobacteria</b>	7,6 %	6,0 %	4,8 %
<b><math>\beta</math>-Proteobacteria</b>	7,2 %	2,4 %	9,6 %
<b>Spirochaetes</b>	3,6 %	4,1 %	1,4 %
<b>Sphingobacteria</b>	3,4 %	4,0 %	4,7 %
<b>Bacilli</b>	3,0 %	2,9 %	1,5 %
<b>Clostridia</b>	2,8 %	1,1 %	1,4 %
<b>Flavobacteria</b>	2,6 %	4,2 %	5,2 %
<b>Bacteroidetes</b>	2,2 %	2,4 %	0,5 %
<b>Acidobacteria</b>	1,8 %	0,1 %	0,2 %
<b>Planctomycetacia</b>	1,7 %	0,9 %	1,1 %
<b><math>\delta</math>-Proteobacteria</b>	1,7 %	0,5 %	1,9 %
<b>Thermoprotei</b>	0,9 %	0,7 %	0,4 %
<b><math>\epsilon</math>-Proteobacteria</b>	0,8 %	3,4 %	4,2 %
<b>Verrucomicrobiae</b>	0,6 %	0,7 %	0,2 %
<b>Mollicutes</b>	0,4 %	1,1 %	0,6 %

Tabelle 3.7 vergleicht die bakteriellen Symbionten anderer Ameisen, die oder deren nächst verwandte Gattungen in *Pseudomyrmex* ebenfalls nachgewiesen wurden und gibt die jeweiligen Trefferwerte (TReFID score) und die Ergebnisse der Identifikation des Datenbankeintrags (*Ribosomal Database Project II*) an. Außerdem sind jene Gattungen markiert, die mit anderen Methoden (Kultivierung und Klonbibliothek des 16S rRNA-Gens) nachgewiesen wurden. Diese Aufstellung ermöglicht zudem eine Abschätzung, ab welcher Trefferwertgrößenordnung (TReFID score) die tatsächliche Gegenwart eines Bakteriums in der Probe wahrscheinlich ist. Ausgehend von *Pantoea*, *Erwinia* u. a. scheinen dies ab 80 % (TReFID score) gegeben zu sein.



**Abbildung 3.20: Vergleich der drei diversesten Proteobakterienklassen zwischen *P. ferrugineus*, *P. gracilis* und *P. salvini***

Diversität der Proteobakterienklassen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria dargestellt als prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster (Durchschnittswerte aller Analysen der jeweiligen Ameisenart; *P. ferrugineus* n = 7, *P. gracilis* n = 13) und *P. salvini* n = 6) nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA Proteobakterien. Auf die Aufteilung der Ordnungen für die Klassen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteobacteria bei *P. salvini* wurde verzichtet, da die tRF-Musterzahl bei dieser Art für diese Gruppen sehr gering war. Zusammensetzung (in Ordnungen) der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria: A: Acidithiobacillales; B: Thiotrichales; C: Chromatiales; D: Xanthomonadales; E: Oceanospirillales; F: Enterobacteriales; G: Alteromonadales; H: Pasteurellales; I: Pseudomonadales; J: Rickettsiales; K: Caulobacterales; L: Sphingomonadales; M: Rhodobacterales; N: Rhodospirillales; O: Rhizobiales; P: Nitrosomonadales; Q: Procabacteriales; R: Hydrogenophilales; S: Methylophilales; T: Neisseriales; U: Rhodocyclales; V: Burkholderiales.



**Tabelle 3.7: Vergleich potenzieller Ameisensymbionten**

Diese Tabelle führt bakterielle Symbionten anderer Ameisen auf, die oder deren nächst verwandte Gattungen in *Pseudomyrmex* ebenfalls nachgewiesen wurden. Übereinstimmungen auf Gattungsniveau sind fett gedruckt hervorgehoben.

\*) Identifiziert mit *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>).

\*\*) Der TReFID “score” bezieht sich auf die Übereinstimmung des ausgehend vom Datenbankeintrag prognostizierten tRF-Muster mit dem in der Probe nachgewiesenen tRF-Mustern.

\*\*\*) Diese Gattungen wurden mit mehreren unabhängigen Methoden für *Pseudomyrmex* nachgewiesen.

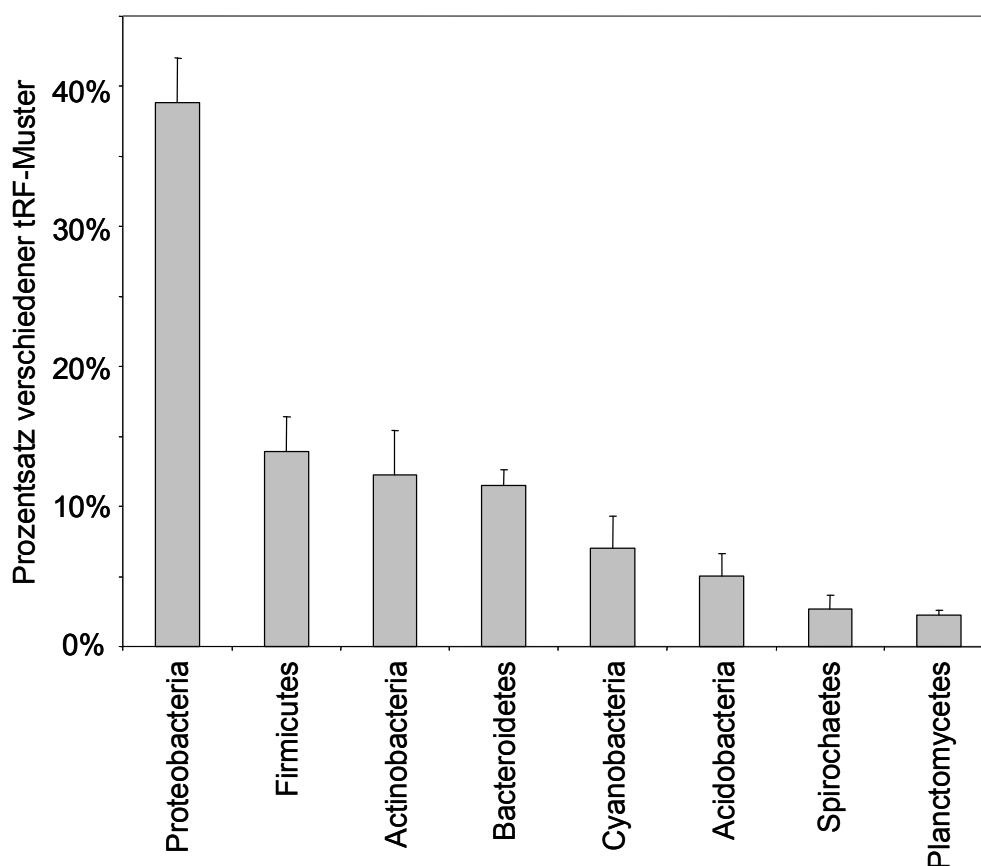
Ameisengattung und Literaturquelle	Gattung	Verwandte Gattungen, die mit TReFID in <i>Pseudomyrmex</i> gefunden wurden	Ribosomal Classifier-value*	TReFID score**
<i>Tetraponera</i> (Van Borm <i>et al.</i> 2002b)	<b><i>Rhizobium</i></b> (AF459798)	<b><i>Rhizobium</i></b> <i>Azorhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Mesorhizobium</i> *** <i>Sinorhizobium</i>	100 % 100 % 100 % 100 % 94 %	77 % - 100 % 90 % - 100 % up to 92 % up to 92 % 83 %
	<b><i>Methylobacterium</i></b> (AF459799)	<b><i>Methylobacterium</i></b> <i>Microvirga</i>	100 % 95 %	78 % - 100 % 80 % - 90 %
<i>Tetraponera</i> (Van Borm <i>et al.</i> 2002b)  <i>Atta</i> (Santos <i>et al.</i> 2004)	<b><i>Burkholderia</i></b> (AF459796)	<b><i>Burkholderia</i>***</b> <i>Achromobacterium</i> <i>Acidovorax</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Aquabacterium</i> <i>Bordetella</i> <i>Caenibacterium</i> <i>Chitinimonas</i> <i>Collimonas</i> <i>Cupriavidus</i> *** <i>Delftia</i> <i>Herbaspirillum</i> *** <i>Janthinobacterium</i> <i>Pandoraea</i> *** <i>Ralstonia</i>	100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 %	80 % - 100 % 78 % - 100 % 78 % - 100 % up to 95 % 77 % - 100 % up to 95 % up to 95 % 80 % - 100 % 80 % - 100 % 77 % - 100 % 77 % - 100 % 77 % - 100 % 83 % - 100 % up to 95 % up to 91 %
<i>Tetraponera</i> (Van Borm <i>et al.</i> 2002b)	<b><i>Pseudomonas</i></b> (AF459797)	<b><i>Pseudomonas</i></b> <i>Cellvibrio</i>	100 % 100 %	80 % 80 % - 100 %
	<b><i>Flavobacterium</i></b> (AF459795)	<b><i>Flavobacterium</i></b> <i>Aequorivita</i> <i>Bergeyella</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Cellulophaga</i> <i>Chryseobacterium</i> <i>Elizabethkingia</i>	100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 %	78 % - 100 % up to 91 % up to 95 % 77 % - 100 % up to 90 % 77 % - 100 % up to 86 %
<i>Tetraponera</i> , <i>Dolichoderus</i> (Stoll <i>et al.</i> 2007)	<b><i>Bartonella</i></b>	<b><i>Bartonella</i></b>	100 %	80 % - 100 %
	<b><i>Sodalis</i></b>	<b><i>Sodalis</i></b>	100 %	78 % - 83 %

	<b><i>Enterobacter</i></b> <b><i>Pantoea</i></b>	<b><i>Enterobacter***</i></b>	100 %	up to 85 %
		<b><i>Pantoea***</i></b>	100 %	82 %
		<i>Buchnera</i>	100 %	78 % - 90 %
		<i>Blochmannia</i>	(92/94 % So.)	79 %
		<i>Citrobacter</i>	100 %	up to 90 %
		<i>Erwinia***</i>	100 %	up to 85 %
		<i>Escherichia</i>	100 %	80 % - 90 %
		<i>Klebsiella</i>	100 %	78 % - 91 %
		<i>Khuyvera</i>	100 %	78 % - 91 %
		<i>Morganella</i>	100 %	80 % - 91 %
		<i>Salmonella</i>	100 %	78 % - 88 %
		<i>Serrartia***</i>	100 %	78 % - 95 %
	<b><i>Wolbachia</i></b>	<b><i>Wolbachia</i></b>	100 %	up to 100 %
		<i>Rickettsia</i>	100 %	78 % - 100 %
	<b><i>Bacillus</i></b>	<b><i>Bacillus***</i></b>	100 %	77 % - 100 %
		<i>Exiguobacterium</i>	100 %	78 % - 94 %
		<i>Geobacillus</i>	100 %	77 % - 90 %
		<i>Ureibacillus</i>	100 %	86 % - 100 %
	<b><i>Leptospira</i></b>	<b><i>Leptospira</i></b>	100 %	79 % - 100 %
		<i>Leptonema</i>	100 %	85 %
	<b><i>Brevibacterium</i></b>	<b><i>Brevibacterium</i></b>	100 %	78 % - 100 %
<i>Acromyrmex</i> (Zhang <i>et al.</i> 2007)	<b><i>Pseudonocardia</i></b>	<b><i>Pseudonocardia</i></b>	100 %	Up to 88 %

### 3.3 Reproduzierbarkeit der tRFLP-Methode

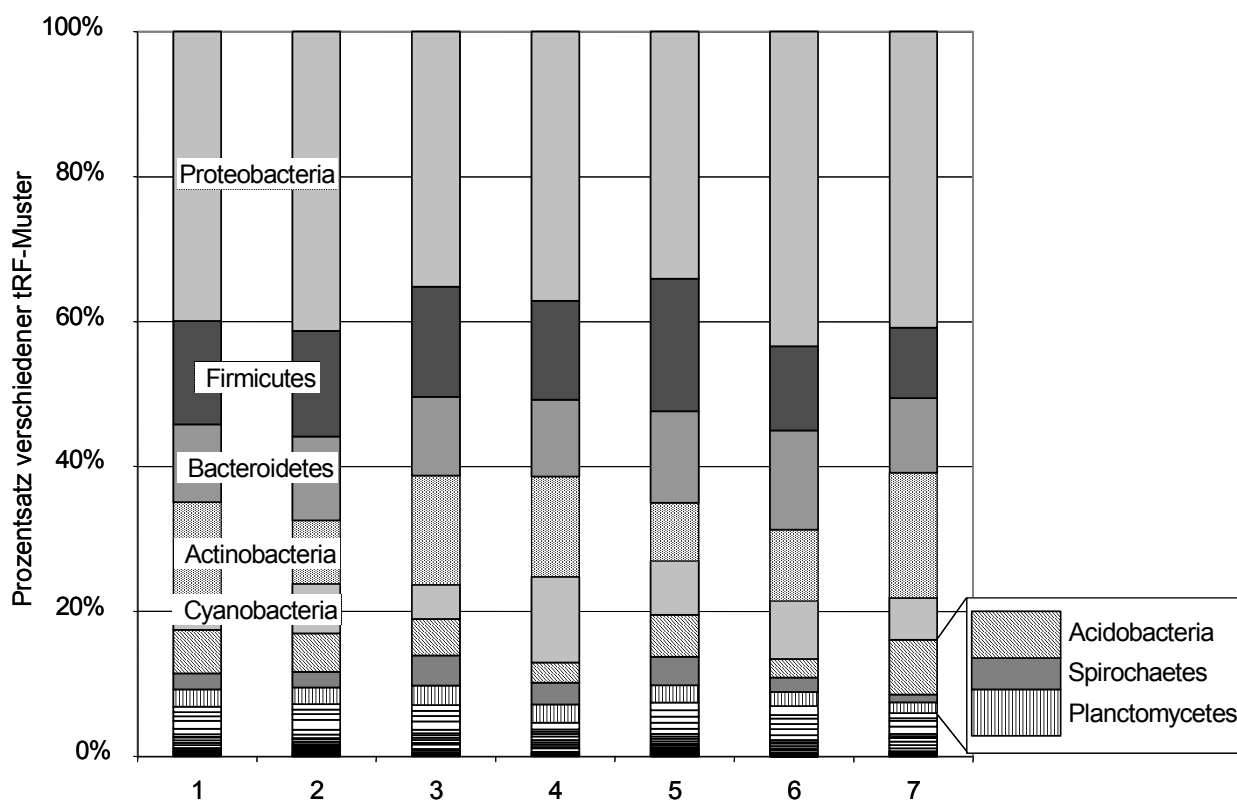
Um die Reproduzierbarkeit der hier angewandten tRFLP-Methode zu überprüfen, wurde eine Probe Larven (im L3-Stadium) von *Pseudomyrmex ferrugineus* einer wiederholten Analyse unterzogen. Die Gesamt-DNA wurde aus den Larven extrahiert und damit sieben unabhängige PCR-Reaktionen mit den unter Material und Methoden aufgeführten universellen bakteriellen Primerpaar für das 16S rRNA-Gen durchgeführt. Die Produkte dieser Reaktionen wurden verdünnt und ihrerseits als Vorlagen (Templates) für anschließende PCR eingesetzt, bei der der Fluorochrom-markierte Primer 63F zum Einsatz kam. Die markierten Amplifikate wurden aufgereinigt und auf 7 mal 13 Restriktionsansätzen (13 verschiedene Restriktionsenzyme pro Durchgang) verteilt. Die durch den Verdau entstehenden Fragmente wurden einer Fragmentanalyse, wie unter Kapitel 2 Material und Methoden beschrieben, zugeführt. Nach Aufarbeitung der Datensätze wurden TReFID-Analysen der sieben Datensätze durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet. Die mehrfachen Analysen derselben Ausgangsprobe zeigten dabei eine hohe qualitative Reproduzierbarkeit. 2550 der insgesamt 5401 auftretenden verschiedenen tRF-Muster konnten in allen sieben Durchgängen identifiziert werden. Insgesamt nur 11 tRF-Muster

wurden in drei oder weniger der sieben Analysen angetroffen. Trotz variierender tRF-Musterzahlen entsprachen sich die bakteriellen Gesellschafts- bzw. Diversitätsprofile im relativen Verhältnis der Taxa untereinander im hohen Maße (Abbildung 3.22). Die Anteile der unterschiedlichen tRF-Muster pro Taxon blieben bezogen auf die Gesamtzahl der tRF-Muster stabil (Abbildung 3.21). Wie bereits bei den anderen *P. ferrugineus*-Proben erwiesen sich die Divisionen Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Acidobacteria, Spirochaetes und Planctomycetes als die Gruppen, die mit besonders vielen unterschiedlichen tRF-Mustern vertreten waren.



**Abbildung 3.21: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus* – Test auf Reproduzierbarkeit.**

Prozentsätze der tRF-Muster (terminale Restriktionsfragmente-„fingerprints“) der Bakteriendivisionen assoziiert mit *P. ferrugineus*. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten wurden sieben unabhängige DNA-Isolierungen, 16S rDNA-PCR und Restriktionsansätze sowie sieben tRF-Analysen mit TReFID durchgeführt (n=7). Als Ausgangsproben dienten Larven einer *P. ferrugineus*-Kolonie. Die Ergebnisse der sieben Proben wurden zusammengefasst und die Standardabweichung berechnet. Abgebildet sind jene acht Divisionen, die zusammen im Durchschnitt 93 % der tRF-Muster der sieben Wiederholungen ausmachten.



**Abbildung 3.22: Prozentuale Aufteilung der tRFLP-Muster nach taxonomischen Gruppen aus der TReFID-Auswertung von 16S rDNA-tRFLPs aus Gesamt-DNA von *Pseudomyrmex ferrugineus* – Test auf Reproduzierbarkeit.**

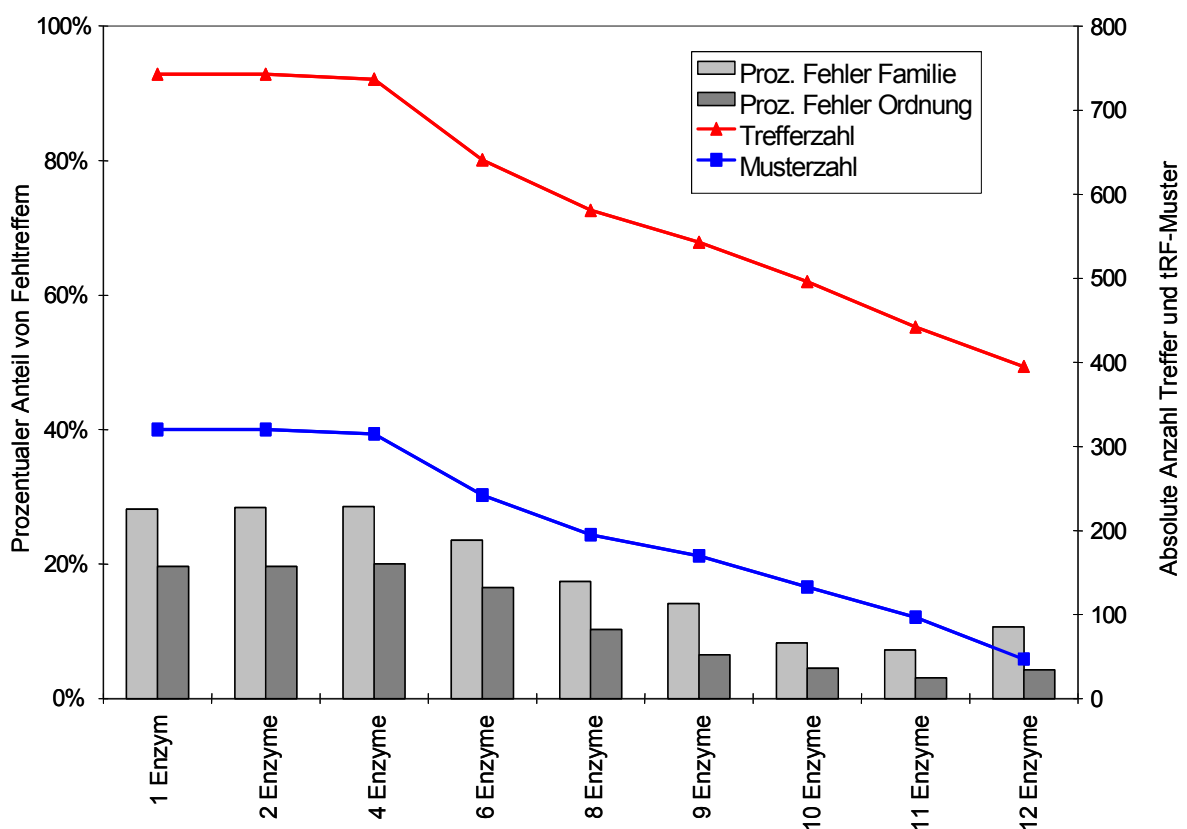
Abbildung zur Reproduzierbarkeit der tRF-Analyse. Vergleichende Darstellung der Diversität der sieben unabhängigen Analysen der Probe mit allen bakteriellen Divisionen. Prozentuale Darstellung. Nur die größten Gruppen sind beschriftet (basiert auf 16S rDNA-PCR).

### 3.4 Überprüfung von TReFID

Insbesondere zur Überprüfung der deutlich aufgestockten Datenbank (siehe Abschnitt 2.5.3; derzeit 22.239 Einträge) wurden Fragmentdatensätze einer künstlichen Mischung von *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense* und *Rhizobium leguminosarum* unter unterschiedlichen Programmeinstellungen analysiert. Bei der Grundeinstellung (13 Fragment-Einzeldatensätze) wurden nur solche Datenbank-Einträge als in der Probe nachgewiesen eingestuft, welche zumindest zehn der 13 prognostizierten terminalen Fragmente aufwiesen (Ausnahmen: Die Sequenz des Datenbank-Eintrags weist im untersuchten Bereich der 16S rRNA-Gens keine Restriktionsstelle auf). Unter diesen Bedingungen konnten für die künstliche Fragmentmischung 121 tRF-Muster detektiert werden, von denen 71 Muster den Enterobacteriaceae (und zwar der nächsten Verwandtschaft von *E. coli*), 41 Muster den Rhizobiaceae (*R. leguminosarum*) und drei Muster den Rhodospirillaceae (*A. brasilense*)

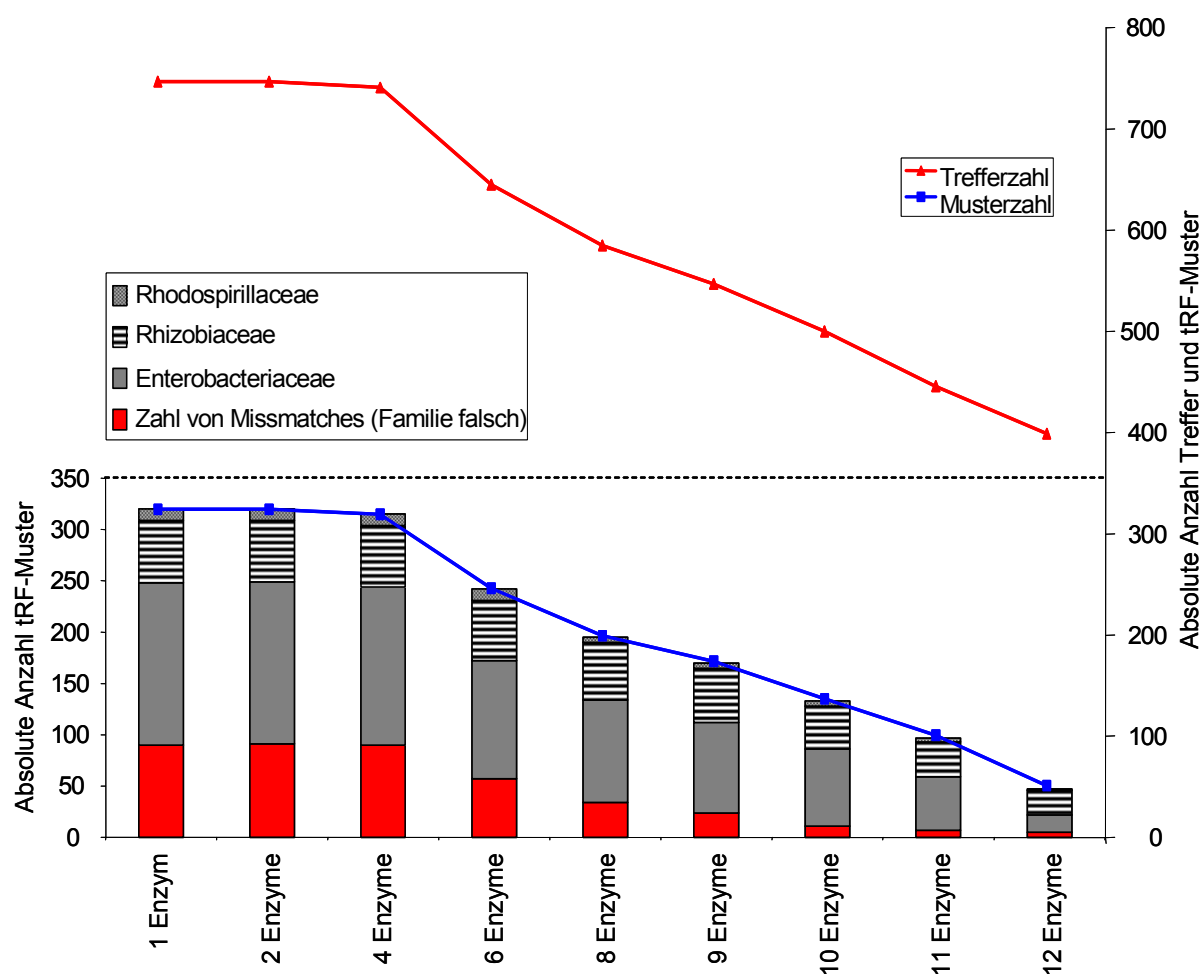
zugeordnet werden konnten. Sechs Muster konnten zwar den Rhizobiales zugerechnet werden, verfehlten aber die korrekte Familienzugehörigkeit.

Die Abbildungen 3.23 und 3.24 illustrieren die verschiedenen Resultate der TReFID-Analyse bei unterschiedlichen Programmeinstellungen (Anzahl prognostizierter tRF-Muster in Relation zur Enzymzahl). Eine Fokussierung wurde mit zunehmender Enzymzahl und dadurch abnehmender Fehlidentifizierungen (rot in den Abbildungen) deutlich. Bild 3.23 zeigt, dass ab einer Anzahl von 10 verschiedenen Restriktionsenzymen die Grenze der möglichen Auflösungsverbesserung der Ergebnisse erreicht wurde. Der Anteil fälschlicher-



**Abbildung 3.23: Verhältnis von irrtümlich identifizierten Taxa zur Anzahl der verwendeten Enzyme und zur absoluten Anzahl von Treffern und tRF-Mustern.**

Analysiert wurde eine künstlich zusammengestellte Probe aus *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* und *Azospirillum brasilense*. Mit zunehmender Anzahl von Restriktionsenzymen, die für die Analyse eingesetzt werden, wird das Ergebnis zunehmend fokussiert – die Anzahl verschiedener Treffer (Bakterien der Datenbank, die der Probe zugeordnet werden) sowie die zu Grunde liegende tRF-Musteranzahl nehmen ab. Der Anteil fälschlicherweise nachgewiesener Ordnungen beträgt bei bis vier verschiedenen Enzymen knapp 20 % der Treffer und nimmt auf knapp 4 % bei elf bzw. 12 verschiedenen Enzymen ab (Im konkreten Fall handelt es sich um zwei falsch identifiziertes Muster von 47 Mustern insgesamt, welche 4 % ausmachen - Es kann bei dieser Betrachtung jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass fehlerhaft taxonomisch eingruppierte Referenzsequenzen der NCBI-Datenbank zu Fehlidentifikationen führen.).

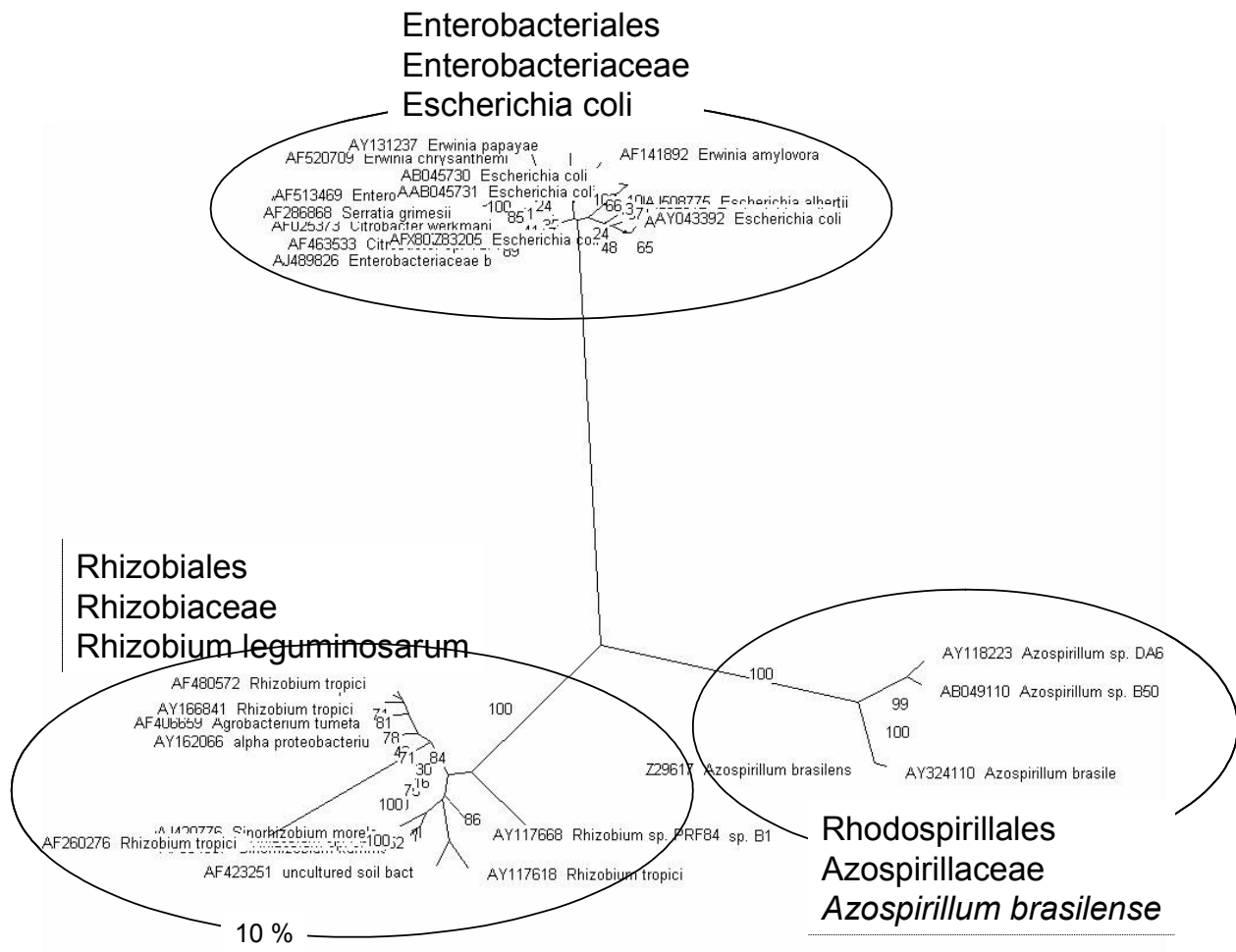


**Abbildung 3.24: Verhältnis von irrtümlich identifizierten Taxa zur Anzahl der verwendeten Enzyme und zur absoluten Anzahl von Treffern und tRF-Mustern.**

Analysiert wurde eine künstlich zusammengestellte Probe aus *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* und *Azospirillum brasilense*. Mit zunehmender Anzahl von Restriktionsenzymen, die für die Analyse eingesetzt werden, wird das Ergebnis zunehmend fokussiert – die Anzahl verschiedener Treffer (Bakterien der Datenbank, die der Probe zugeordnet werden) sowie die zu Grunde liegende tRF-Musteranzahl nehmen ab. Bei 12 Enzymen wurden noch 47 tRF-Muster identifiziert: 17 tRF-Muster für Enterobacteriaceae (*E. coli*), 27 tRF-Muster für Rhizobiaceae (*R. leguminosarum*), 1 tRF-Muster für Rhodospirillaceae (*A. brasilense*).

weise nachgewiesener Ordnungen beträgt bei bis vier verschiedenen Enzymen knapp 20 % der Treffer und nimmt auf knapp 4 % bei elf bzw. 12 verschiedenen Enzymen ab. Die zugrunde liegenden Ergebnisse dieser Überprüfung führten dazu, dass für die weitere Auswertung aller Daten nur solche Taxa als für die Probe identifiziert galten, wenn zumindest fünf unabhängige tRF-Muster die Gegenwart in der Probe bestätigen. Zudem wurden Datenbankeinträge von (ungewöhnlichen, seltenen) Bakteriengruppen, die nur mit wenigen Mustern repräsentiert wurden, taxonomisch überprüft. Abbildung 3.25 illustriert die TReFID-Ergebnisse dieser Überprüfung als phylogenetischen Stammbaum. Für jede Bakterienart

(Ribotyp/Stamm) in der künstlichen Probe wurden von TReFID mehrere Treffer (Datenbankeinträge) gefunden, die mit den tRF-Mustern der künstlichen Probe übereinstimmten. Daher enthält das Dendrogramm (Abbildung 3.25) für jedes Bakterium der



**Abbildung 3.25: Dendrogramm der Datenbanksequenzen (Treffersequenzen) der TReFID-Analyse einer künstlich zusammengestellten Probe aus *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* und *Azospirillum brasilense*.**

Analysiert wurde eine künstlich zusammengestellte Probe aus *Escherichia coli*, *Rhizobium leguminosarum* und *Azospirillum brasilense*. Das Dendrogramm zeigt die von TReFID angegebenen Treffersequenzen der Datenbank. Nur solche Sequenzen wurden herangezogen, die von namentlich bekannten Typus-Stämmen stammen. In der NCBI-Datenbank nicht näher identifizierte Umweltproben wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht berücksichtigt. (Bootstrapp N-J Tree; ClustalX 1.8; 100 replikationen). Nähere Anmerkungen im Text Abschnitt 3.4.

künstlichen Probe einen ganzen Schwarm verschiedener Datenbankeinträge (Datenbanksequenzen). Eine Identifikation bis Familienniveau ergab demnach für diese Probe Enterobacteriaceae, Rhizobiaceae und Rhodospirillaceae und auf Gattungsniveau für

*Escherichia*, *Rhizobium* und *Azospirillum*. Allerdings erschienen unter den Treffern auch Einträge für die nächst verwandten Gattungen von *Escherichia*: *Salmonella*. Auf Gattungsniveau sind die eng miteinander verwandten Enterobacteriaceae mit tRF-Profilen allein also nur noch schwer aufzulösen. Deshalb werden Aussagen zur Diversität nur auf tRF-Muster bezogen. Gattungen werden nur dann als in der Probe präsent aufgefasst, wenn spezifische Muster, die wiederholt auf die Gegenwart einer bestimmten Gattung hinweisen, auftreten. Auf der Ebene von Ribotypen (Arten; siehe Einleitung) kann keine Aussage getroffen werden.

### 3.5 Ethin-Reduktionstest

Die Freisetzung von Ethen konnte bei Inkubation unter einer Ethinatmosphäre bei Arbeiterinnen und Larven *P. gracilis* und *P. salvini* wiederholt gemessen werden. Für die Ethinreduktionsmessung der noch nicht näher bestimmten, mutmaßlich generalistisch lebenden *Pseudomyrmex* sp. PSW06 standen nur wenige Arbeiterinnen zur Verfügung. Dabei konnte Ethen nachgewiesen werden. Für die obligaten Akazienameisen *P. ferrugineus* und *P. peper*i konnte keine Ethenfreisetzung nachgewiesen werden (Tabelle 3.8). Abbildung 3.26 basiert allein auf den Daten der Experimente, bei denen eine Ethenfreisetzung nachgewiesen werden konnte. Weitere Anmerkungen zu den Ergebnissen in Abschnitt 4.3.4.

**Tabelle 3.8: Ethin-Reduktion**

Ergebnisse des Ethinreduktionstests, sowie Aufstellung der jeweils nachgewiesenen bakteriellen Isolate und PCR-Test dieser Isolate auf Vorhandensein eines *nifH*-Gens mit den unter 2.8.8. aufgeführten Primern.

\*) nur tatsächlich über Kultivierungsverfahren isolierte Bakterien; die tRF-Daten deuten bei *P. ferrugineus*, *P. gracilis* und *P. salvini* noch auf mehrer weitere Taxa, die das Nitrogenase-Gen besitzen müssen.

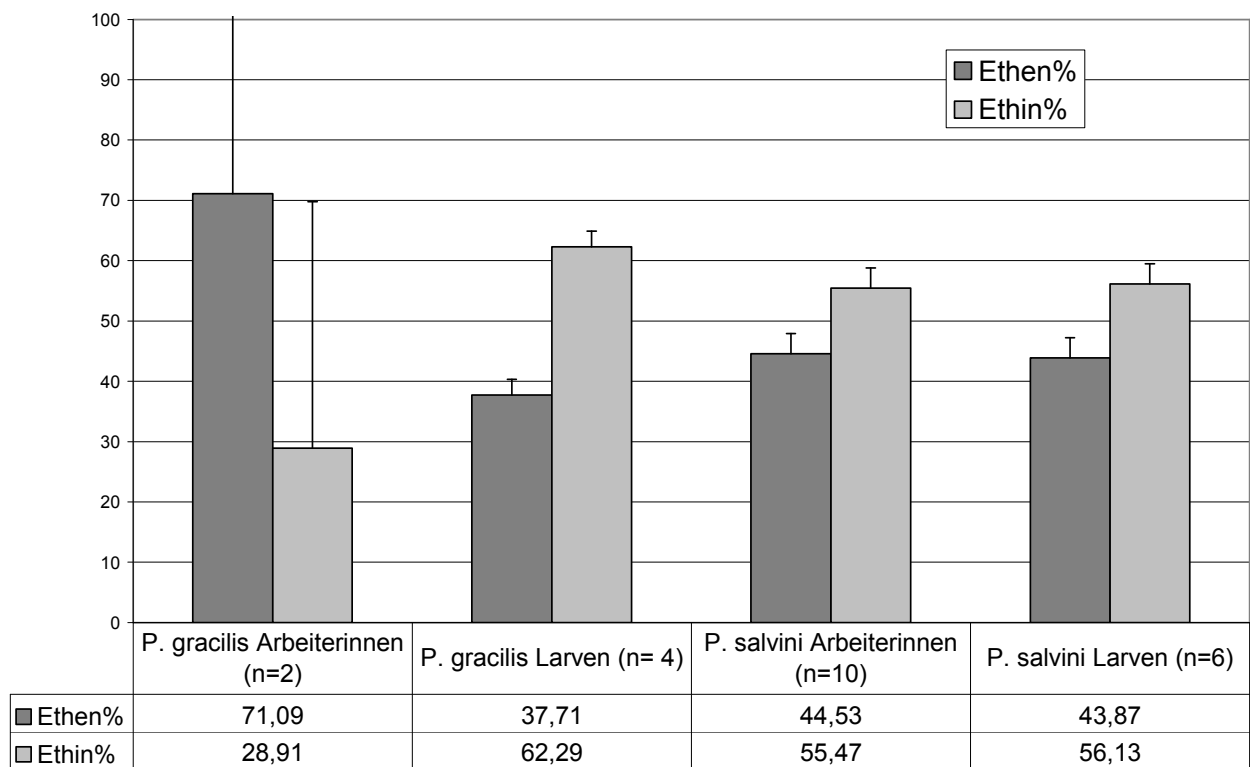
\*\*) aufgrund begrenzter Ameisenzahl nur zwei Stichproben möglich.

\*\*\*) Abbildung 3.7.1

Ameisenart	Ethin-Reduktion	Isolate*	Isolate auf <i>nifH</i> -PCR positiv getestet
<i>P. ferrugineus</i>	Nein	<i>Pantoea</i> <i>Serratia</i> <i>Burkholderia</i>	Ja Ja Ja
<i>P. peper</i> i	Nein	n. d.	n. d.
<i>P. gracilis</i>	Ja (Grafik***)	<i>Pantoea</i>	Ja
<i>P. salvini</i>	Ja (Grafik)	<i>Serratia</i>	Ja
PSW06	(Ja)**	n. d.	n. d.



% Ethen bzw. Ethin

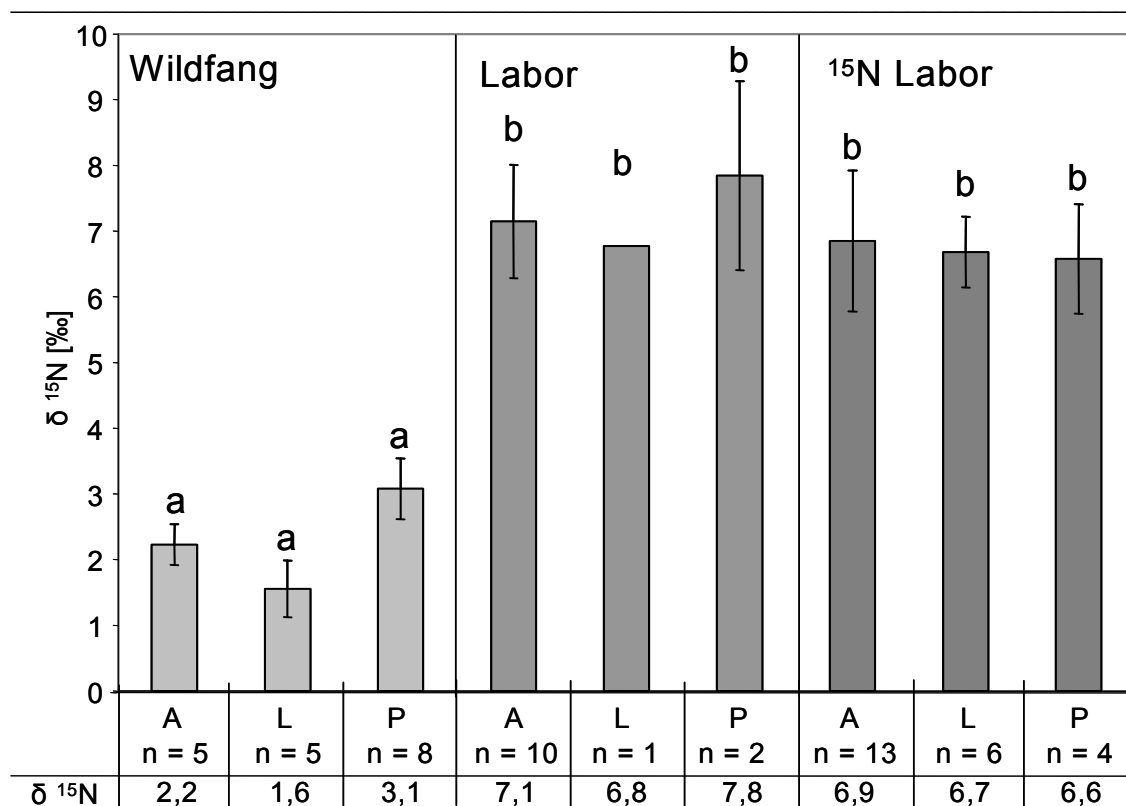


**Abbildung 3.26: Ethinreduktion bei Ameisen**

Reduktion von Ethin zu Ethen innerhalb von 10 Minuten bei 30°C.

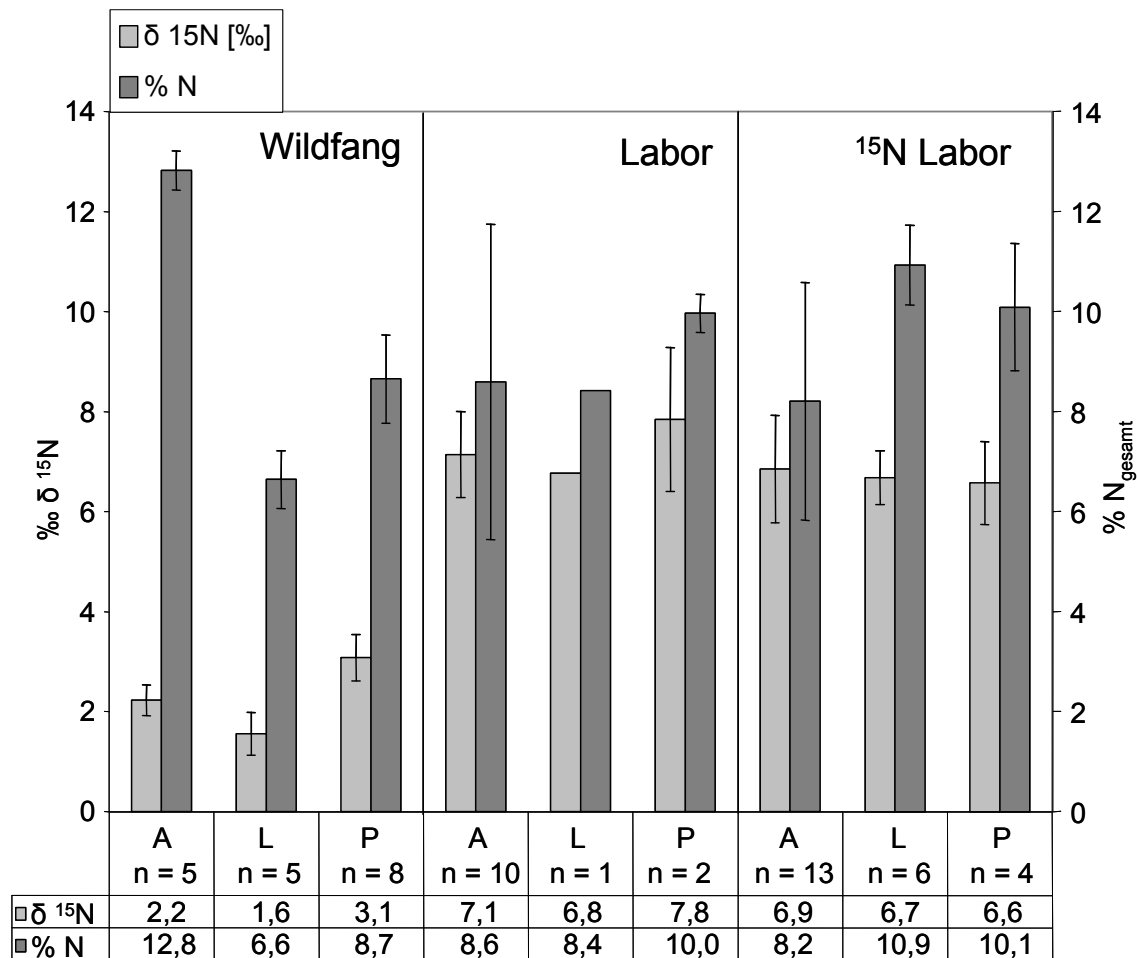
### 3.6 Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$

Die Messungen des stabilen Isotopenverhältnisses  $\delta^{15}\text{N}$  erfolgten nach der unter 2.4.2 beschriebenen Methode. Die Abbildungen 3.27 und 3.28 illustrieren die Ergebnisse für die Ameisenart *Pseudomyrmex salvini*. Mit durchschnittlich 2 ‰ bis 3 ‰ wiesen die Wildfangpräparate das geringste  $\delta^{15}\text{N}$ -Isotopenverhältnis im Vergleich auf. Dagegen lagen die Werte der im Labor befindlichen Kolonie von *P. salvini* um 7 ‰. Der Kolonieteil, der über einen Zeitraum von vier Wochen unter einer 10 ‰igen  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre gehalten wurde (Abb.:  $^{15}\text{N}$  Labor), zeigte



**Abbildung 3.27: Analyse des Anteils des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  bei *P. salvini*.**

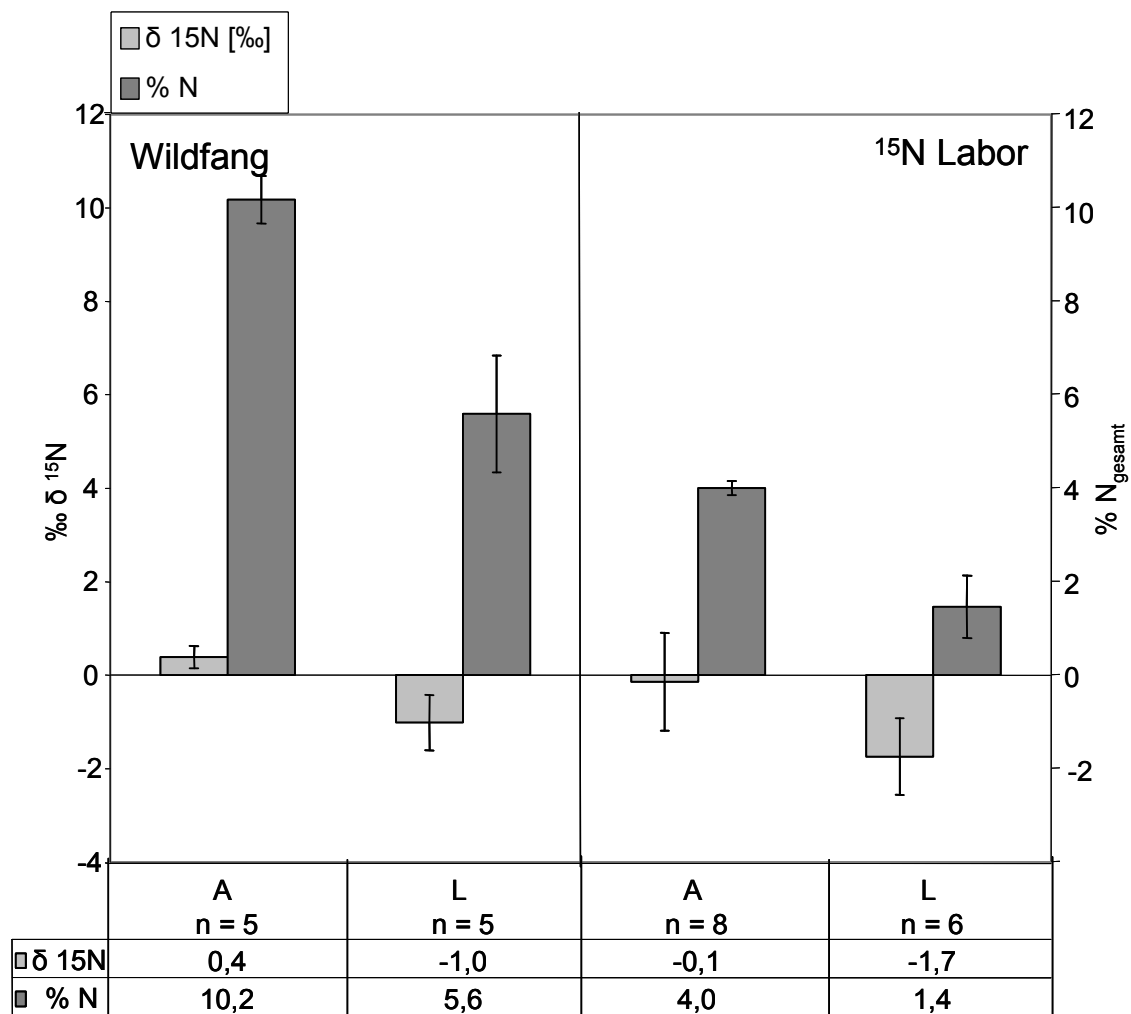
Die Wildfang-Präparate unterscheiden sich in ihrem  $\delta^{15}\text{N}$ -Isotopenverhältnis hochsignifikant von der Laborkolonie (p-Wert 0,000000). Die unter  $^{15}\text{N}$ -Atmosphäre gehaltenen Ameisen ( $^{15}\text{N}$  Labor) weisen gegenüber der Laborkolonie keinen erhöhten  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert auf.  $\delta^{15}\text{N}$  = Abweichung des Isotopenverhältnisses vom internationalen Standard in ‰. Wildfang = Ameisenpräparate vom Naturstandort, Labor = *P. salvini*-Kolonie in Laborhaltung;  $^{15}\text{N}$  Labor = *P. salvini*-Kolonie nach vierwöchiger Haltung unter 10 ‰iger  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre, A = Arbeiterinnen, L = Larven, P = Puppen. Messgenauigkeit des Geräts:  $\pm 0,08$  ‰ anhand internen Standards (alice-1) ermittelt.



**Abbildung 3.28:** Analyse des Anteils des stabilen Isotops <sup>15</sup>N bei *P. salvini* im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge.

Die Werte für  $\delta^{15}\text{N}$  werden hier den Werten des Gesamtstickstoffanteils der Proben gegenübergestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede im Gesamtstickstoffanteil zwischen Wildfangpräparaten und der Laborkolonie, die die  $\delta^{15}\text{N}$ -Abweichung zwischen Wildfang und Laborkolonie erklären könnten.  $\delta^{15}\text{N}$  = Abweichung des Isotopenverhältnisses vom internationalen Standard in ‰, % N = Stickstoffanteil an der Probe in Prozent, Wildfang = Ameisenpräparate vom Naturstandort, Labor = *P. salvini*-Kolonie in Laborhaltung; <sup>15</sup>N = *P. salvini*-Kolonie nach vierwöchiger Haltung unter 10 %iger <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Atmosphäre, A = Arbeiterinnen, L = Larven, P = Puppen. Messgenauigkeit des Geräts:  $\pm 0,08$  ‰ und  $\pm 0,08$  % anhand internen Standards (alice-1) ermittelt.

gegenüber der Referenz (Abb.: Labor) keine <sup>15</sup>N-Anreicherung. Damit wich die Laborkolonie – unabhängig davon ob Referenz oder <sup>15</sup>N-Versuch – hochsignifikant von den Wildfangpräparaten ab, die August 2007 in Los Tuxtlas (Veracruz, Mexiko) gesammelt wurden. Wie aus Abbildung 3.8.2 ersichtlich wird, kann dieser deutlich niedrigere  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der Wildfangproben nicht auf unterschiedliche Gesamtstickstoffmengen zurückgeführt werden, da der durchschnittliche Stickstoffgehalt sowohl der Laborkolonie als auch der Wildfangpräparate bei 9,4 % der Trockenmasse lag. In Abschnitt 4.3.5 dieser Arbeit wird diese Abweichung als ernährungsbedingtes Phänomen diskutiert.



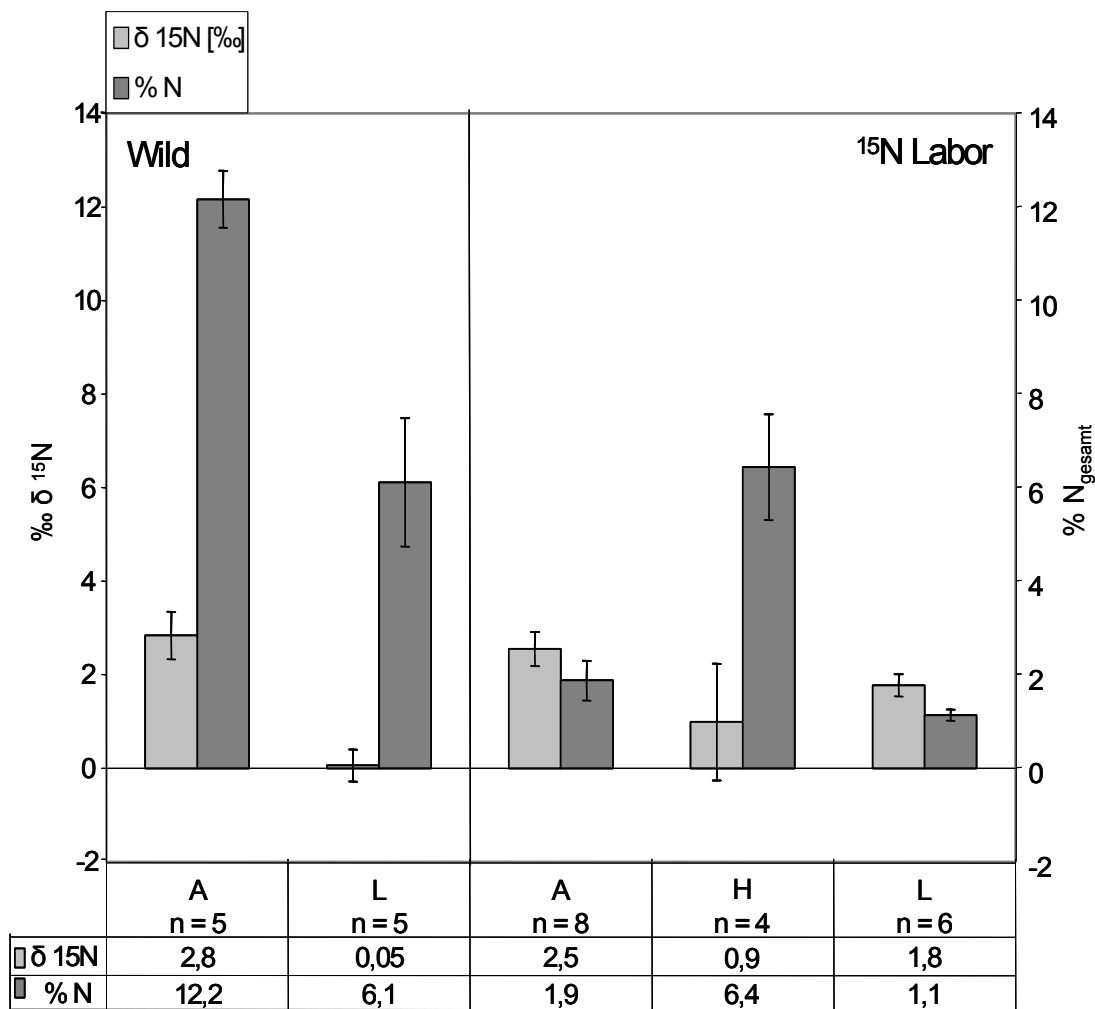
**Abbildung 3.29: Analyse des Anteils des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  bei *P. ferrugineus* im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge.**

Die Werte für  $\delta^{15}\text{N}$  werden hier den Werten des Gesamtstickstoffanteils der Proben gegenübergestellt. Der Gesamtstickstoffanteil ebenso wie der Anteil des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  liegt innerhalb der natürlichen Schwankungen.  $\delta^{15}\text{N}$  = Abweichung des Isotopenverhältnisses vom internationalen Standard in ‰, % N = Stickstoffanteil an der Probe in Prozent, Wildfang = Ameisenpräparate vom Naturstandort,  $^{15}\text{N}$  = *P. ferrugineus*-Kolonie nach einwöchiger Haltung unter 10 %iger  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre, A = Arbeiterinnen, L = Larven, P = Puppen.

Abbildung 3.29 illustriert die Resultate der Stickstoffmessung der obligaten Akazienameise *Pseudomyrmex ferrugineus*. Der über einwöchige am MPI für chemische Ökologie in Jena durchgeführte Versuch (Kolonieteil unter 10 %igen  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre) zeigte keine Anreicherung des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}_2$  gegenüber den *P. ferrugineus*-Proben aus Wildfangherkunft. Der durchschnittliche  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert lag bei -0,62 ‰.

Die darauf folgende Abbildung 3.30 zeigt die Ergebnisse für die Stickstoffmessung bei *P. gracilis*. Auch hier wurden Wildproben mit Werten einer Kolonie verglichen, die eine Woche unter einer 10 %igen  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre gehalten wurden. Eine Anreicherung von  $^{15}\text{N}$

gegenüber den Referenzproben konnte auch hier nicht verzeichnet werden. Der durchschnittliche  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert lag bei 1,64 ‰.



**Abbildung 3.30: Analyse des Anteils des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  bei *P. gracilis* im Vergleich zur Gesamtstickstoffmenge.**

Die Werte für  $\delta^{15}\text{N}$  werden hier den Werten des Gesamtstickstoffanteils der Proben gegenübergestellt. Der Gesamtstickstoffanteil ebenso wie der Anteil des stabilen Isotops  $^{15}\text{N}$  liegt innerhalb der natürlichen Schwankungen.  $\delta^{15}\text{N}$  = Abweichung des Isotopenverhältnisses vom internationalen Standard in ‰, % N = Stickstoffanteil an der Probe in Prozent, Wildfang = Ameisenpräparate vom Naturstandort;  $^{15}\text{N}$  = *P. gracilis*-Kolonie nach einwöchiger Haltung unter 10 ‰iger  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre, A = Arbeiterinnen, L = Larven, H = Hämolymphe (aus Larven im dritten Larvenstadium; die Larven wurden dazu mit einem Skalpell angeritzt und die austretende Flüssigkeit mit einer Pipette abgenommen), P = Puppen.

## 4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Diversität der Mikroorganismenpopulation zu untersuchen, die in Assoziation mit Pflanzenameisen der Gattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831) im Süden Mexikos lebt. Neben einer deskriptiven Aufnahme der vorhandenen Mikroorganismen mit überwiegend molekularbiologischen Methoden wurden weitere Experimente durchgeführt, welche die potenzielle Bedeutung der nachgewiesenen Bakterien für die Ameise als Wirt und für das mutualistische System Akazie-Ameise-Bakterien aufklären sollten.

### 4.1 Bakteriengemeinschaft der Ameisen

#### 4.1.1 Bakterien und Insekten

Symbiotische Bakterien beeinflussen ihre Wirtsinsekten auf vielfältige Weise. Intrazelluläre Bakterien der Gattung *Wolbachia* (Rickettsiales) können das Geschlechterverhältnis, die Reproduktionsbiologie und Entwicklung ihrer Wirte manipulieren (Wolschin *et al.* 2004, Nakanishi *et al.* 2008, Negri *et al.* 2006). Der Einfluss mancher symbiotischer Bakterien (z. B. *Regiella insecticola*, Enterobacteriales) scheint sich sogar auf Spezialisierungs- (genutzte Wirtspflanze bei herbivoren Insekten) und Speziationsprozesse ihrer Wirte auszuwirken (Leonardo und Mondor 2006, Hosokawa *et al.* 2006, Hosokawa *et al.* 2008), wobei das Überleben eines Insekts auf einer speziellen Wirtspflanze in besonderen Fällen nur vom Vorhandensein spezieller symbiotischer Bakterien (z. B. *Ishikawaella*, Enterobacteriales bei der Wanzenart *Megacopta*) abzuhängen scheint (Hosokawa *et al.* 2007b). Bislang wenig beachtet wurden symbiotische Bakterien, die ihren Wirten Resistenz gegen Pathogene wie Viren verleihen (Haine 2008, Chandler *et al.* 2008, Moran *et al.* 2005a). Alle diese intrazellulären Symbionten rekrutieren sich im Wesentlichen aus den beiden Gruppen Rickettsiales ( $\alpha$ -Proteobacteria) und Enterobacteriales ( $\gamma$ -Proteobacteria), nach denen daher mit molekularen Markern und Sonden selektiv gesucht werden konnte. Diese Bakterien stellen aber nur einen kleinen Teil der Bakteriengesellschaft am oder im Insekt dar. Im Gegensatz zu intrazellulären (und daher meist „vererbbar“) Bakterien (Hilgenboecker *et al.* 2008, Hosokawa *et al.* 2007a, Perlman *et al.* 2006) hängt die Gegenwart, Zusammensetzung und die verursachten Effekte der mit einem Insekt assoziierten Bakteriengemeinschaft auch von äußeren Faktoren wie Ernährung und Klimabedingungen ab (De Vries *et al.* 2004, Chandler *et al.* 2008, Russell und Moran 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein methodischer Ansatz gewählt, der einen relativ umfassenden Überblick über die gesamte Bakteriengemeinschaft einer Umweltprobe ermöglicht (Rösch

und Bothe 2005) und damit genutzt werden kann, um die ökologische und letztlich auch evolutionsbiologische Bedeutung der Bakteriengemeinschaft für den Wirtsorganismus zu analysieren.

#### 4.1.2 Bakteriengemeinschaft der *Pseudomyrmex*

Acht Bakterien-Divisionen repräsentierten den größten Teil (bei *P. ferrugineus* 93 %) aller nachgewiesenen tRF-Muster. Diese Divisionen waren Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria und Spirochaetes. In allen untersuchten Ameisenarten der Gattung *Pseudomyrmex* stellten drei große Klassen der Proteobacteria ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria) die diversesten Gruppen dar, die viele weiterverbreitete bzw. gut bekannte Symbionten anderer Ameisen beinhalten (*Blochmannia*:  $\gamma$ -Proteobacteria; *Wolbachia*:  $\alpha$ -Proteobacteria; Darmbakterien von *Tetraponera*:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria). Zahlreiche dieser Bakteriengattungen wurden bereits als Symbionten anderer Insekten beschrieben (Tabellen 3.3, 3.7, 4.1 und 4.2), während einige andere Gattungen als Symbionten von Pflanzen bekannt sind (Tabelle 4.1: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* and *Mesorhizobium* [Rhizobiales], *Swaminathania* [Rhodospiralles] and *Acidovorax* [Burkholderiales]). Zum Teil handelt es sich auch um bislang eher als frei lebend bekannte Boden- oder aquatische Bakterien (Tabelle 4.1: *Fulvimarina* and *Hyphomicrobium* [Rhizobiales] and *Acetobacter* [Rhodospirillales]). Zusammenfassend wurden 15 Taxa der Eubakterien und Archaeen (Acidobacteria, Aquificae, Chlamydiae, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Gemmatimonadetes, Crenarchaeota, Euryarchaeota, [Rhodospirillales, Oceanospirillales, Xanthomonadales, Lactobacillales, Desulfovibrionales, Methanosarcinales]) hier erstmalig als zu Ameisen assoziiert nachgewiesen.

Obwohl Ameisen (Formicidae) nur eine Familie der Insektenordnung der Hautflügler (Hymenoptera) darstellen, ist ihre ökologische Bedeutung immens (Tobin 1995, Davidson 1997, Davidson und Patrell-Kim 1996). Die eusozialen Gemeinschaften sind sicherlich ein Schlüssel zum Erfolg der Ameisen (Hölldobler und Wilson 1990). Interaktionen mit Mikroorganismen könnten aber ebenfalls einen wesentlichen Anteil am Erfolg der Ameisen haben. Zudem bieten eusoziale Insekten wie Ameisen und Termiten durch das generationsübergreifende Zusammenleben der Individuen und die intensive Brutpflege mit gegenseitiger Fütterung und Reinigung beste Voraussetzungen für die vertikale Transmission komplexer, mutualistischer, mikrobieller Gemeinschaften. Bislang gibt es im Vergleich zu anderen Insektengruppen (wie z. B. Hemiptera) nur relativ wenige Arbeiten, die sich mit Mikroorganismen in Ameisen oder Ameisenstaaten befassen. Bearbeitet wurden bisher die

Interaktion von Pilz züchtenden Ameisen (Attini) mit Actinomyceten (Zhang *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002a), die Symbiose des intrazellulären Bakteriums *Blochmannia* mit Rossameisen (Zientz *et al.* 2006, Sameshima *et al.* 1999, Feldhaar *et al.* 2007), Infektionen mit *Wolbachia* bei Ameisen (Wenseleers *et al.* 1998, Wenseleers *et al.* 2002), die Mitteldarmflora der Feuerameise *Solenopsis* (Li *et al.* 2005) und die Darmflora einiger Arten der Ameisengattung *Tetraponera* (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b). Die genannten Untersuchungen griffen jedoch selektiv bestimmte Bakteriengattungen aus dem Gesamtkontext heraus und gaben somit keinen Überblick über die Bakteriengemeinschaft der jeweils untersuchten Ameisen. Die bakterielle Gesellschaft, die mit den untersuchten Arten der Gattung *Pseudomyrmex* assoziiert ist, stellte sich als weitaus artenreicher heraus, als bisherige Studien an der nächst verwandten Gattung *Tetraponera* (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b) hätten vermuten lassen. So konnten bei den Untersuchungen von *Tetraponera*-Arten insgesamt nur vier verschiedene bakterielle Klassen nachgewiesen werden (Van Borm *et al.* 2002b, Stoll *et al.* 2007). Demgegenüber stehen 13 verschiedene Klassen, die in allen drei untersuchten *Pseudomyrmex*-Arten nachgewiesen werden konnten (Bild 3.20). Im Falle von *P. ferrugineus* deuten die tRFLP-Daten sogar auf die Gegenwart von bis zu 30 Klassen hin.

Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus der Zusammensetzung der mit den drei untersuchten *Pseudomyrmex*-Arten assoziierten Bakterienflora für die Ökologie der Ameisen und der Interaktion von Ameisenpflanze und Ameise ziehen? Welche Funktionen könnten die verschiedenen Bakterientaxa erfüllen? Im Vergleich zu einzelnen Arbeiten über symbiotische oder anderweitig mit Tieren assoziierte Prokaryotengemeinschaften wirkt die hier gefundene Vielfalt unterschiedlicher tRF-Signale fast unwahrscheinlich. Allerdings wurden alle Isolate und bakteriellen Sequenzinformationen (16S rDNA; über PCR, Klonieren und Sequenzieren gefunden) in den Ergebnissen der tRFLP-Analyse mit TReFID wieder gefunden, was die Zuverlässigkeit der Ergebnisse unterstreicht. Außerdem ist bislang sehr wenig über Diversität, Zusammensetzung und Ökologie der Umweltbakteriengemeinschaften bekannt (Pace 1997, Schloss und Handelsman 2004). Neuere molekularbiologische Methoden haben selbst für die Darmfora des Menschen, von der man lange Zeit nur wenige Dutzend bis Hundert unterschiedliche Keime kannte, die Schätzungen auf bis zu 1.800 Genera mit bis zu 36.000 Spezies (Ribotypen) anwachsen lassen (Frank *et al.* 2007). 99 % der Darmflora des Menschen setzen sich dabei aus Firmicuten, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria zusammen (Eckburg und Relman 2007) – Gruppen, die prinzipiell wichtige Darmsymbionten darstellen



(Turnbaugh *et al.* 2007, Xu *et al.* 2007) und auch bei den untersuchten Ameisenarten als dominante Taxa nachgewiesen werden konnten.

#### 4.1.3 Bakterien der Akazien und Ameisen

Um zumindest ansatzweise abschätzen zu können, welche Bakterien permanente Symbionten der Ameisen darstellen und welche Bakterien verbreitete Umweltkeime darstellen, wurden auch die Ameisenakazien auf ihre Bakterienbesiedlung hin untersucht. Durch Kultivierungsverfahren konnten verschiedene bakterielle Isolate aus Blättern wie Nektariengewebe gewonnen werden. Trotz identischer Nährmedien konnten keine Isolate der Gattungen *Burkholderia*, *Variovorax*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Weissella*, *Curtobacterium*, *Enterococcus* und *Lactococcus* aus den Pflanzenproben isoliert werden, obwohl diese Taxa einen großen Teil der in den Ameisen gefundenen Isolate ausmachten (wobei einige Mitglieder der Gattung *Serratia* auch als Endophyten bekannt sind (Benhamou *et al.* 2000)). Zwar machen die kultivierbaren Isolate stets nur einen kleinen Teil der tatsächlichen Diversität aus (Bakken und Olsen 1987, Amann *et al.* 1995, McCaig *et al.* 2001, Joseph *et al.* 2003), dieser Unterschied zwischen den aus Ameisen und Wirtspflanzen isolierten Mikroorganismen zeigt aber doch sehr deutlich, dass sich die Bakterienflora der Ameisen massiv von der ihrer unmittelbaren Umgebung unterschied. Die gewonnen Isolate aus Ameisen wie Pflanzen spiegeln Bedingungen der ursprünglichen Isolationsquellen wieder. Fermentierende Keime wie *Weissella* (Cai *et al.* 1998), *Enterococcus* (Fowler *et al.* 1993), *Lactococcus* und Enterobakterien sprechen für die Herkunft aus dem Insektendarm zumal einige dieser Gattungen aus Ameisen und Bienen bereits bekannt sind (Mohr und Tebbe 2006, Kacaniová *et al.* 2004).

Aufgrund der Schnittmenge von Bakterienisolaten (*Bacillus*, *Pantoea*, *Sphingomonas*), die in Ameisen und Pflanzen vorkommen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Pflanzeameisen Verbreiter von Keimen sind oder sich die Ameisen (ständig) mit Keimen infizieren, die zur bakteriellen Flora der Pflanze gehören. Dieses Phänomen ist für Pflanzensauger (Hemiptera), die *Phytoplasma* (Mollicutes) übertragen, bereits bekannt (Hogenhout *et al.* 2008, Thebaud *et al.* 2008, Fletcher *et al.* 1998, Lee *et al.* 1998, Moya-Raygoza und Nault 1998). Nektarien wurden diesbezüglich oft als „offene Tore“ für endophytische Mikroorganismen diskutiert (Castro und Demarco 2008, Carter *et al.* 2007, McManus *et al.* 1999, Wilson und Lindow 1993). Dies könnte auch auf die EFN der Akazien zutreffen. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass EFN der myrmekophytischen *Acacia*-Arten *A. hindsii* und *A. cornigera* Abwehrenzyme wie Glucanasen und Chitinasen enthält, die

den EFN in erster Linie gegen Pilze und nicht Bakterien schützen; die nicht-myrmekophytische *A. farnesiana* wies dagegen nur Spuren dieser Enzyme auf (Gonzalez-Teuber *et al.* in press). Damit übereinstimmend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass myrmekophytische Akazien (*A. collinsii*, *A. cornigera*, *A. chiapensis*, *A. hindsii*) mit permanenter Nektarproduktion und myrmekophile Pflanzen (*A. cochliacantha*, *A. farnesiana*, *A. macracantha*) mit gelegentlicher Nektarproduktion das Nektarium im Vergleich zur Blattspreite nicht besser gegen Bakterienbesiedlung schützen. Vielmehr scheint es hier Muster für jede einzelne Pflanzenart über die vier verschiedenen Nährmedien hinweg zu geben (siehe Abschnitt 3.1). Bei allen Kulturmedien wiesen die Blätter von *Acacia macracantha* besonders hohe CFU-Zahlen auf, gefolgt von *A. cornigera*. *A. chiapensis* zeigt über alle Medien hinweg hohe CFU-Zahlen in den Nektarien. Sehr geringe CFU-Werte ergaben sich stets für die Nektarien von *A. hindsii*, wogegen in allen Fällen die durchschnittliche CFU-Zahl der Nektarien von *A. collinsii* die CFU-Zahl der Blätter derselben Art übertraf (siehe Abschnitt 3.1). Es sei hier angemerkt, dass zur besseren Vergleichbarkeit nur solche Myrmekophyten für die Untersuchung verwendet wurden, die mit *P. ferrugineus* besiedelt waren. Unterschiede im Schutzeffekt der Ameisen dürften daher irrelevant sein.

#### 4.1.4 Putative Funktionen der Bakterien von *Pseudomyrmex*

Alle untersuchten Kolonien von *P. ferrugineus* und *P. salvini* sowie einige Kolonien von *P. gracilis* wiesen zu den Rickettsiales zählende Bakterien auf. Bislang konnten diesen intrazellularen Bakterien keine klaren Funktionen bei Ameisen zugeschrieben werden. Ihr Status als Parasit wird vielfach diskutiert (Stoll *et al.* 2007, Zientz *et al.* 2005, Van Borm *et al.* 2001, Wenseleers und Billen 2000, Wenseleers *et al.* 1998, Boursaux-Eude und Gross 2000). Ebenfalls konnte für alle drei hier untersuchten Ameisenarten mit der tRFLP-Methode die nur als (z. T. intrazelluläre) Parasiten bekannte Klasse Mollicutes (Division Firmicutes) nachgewiesen werden. Die detektierten tRF-Muster stimmten zu 85 % bis 100 % mit den Gattungen *Entomoplasma* (Tully *et al.* 1998), *Mesoplasma* (Tully *et al.* 1994, Navascastillo *et al.* 1993) und *Phytoplasma* (Lee *et al.* 1998) überein, die alle aus Insekten bekannt sind. Bei der Gattung *Phytoplasma* handelt es sich um ein bekanntes phytopathogenes Bakterium, das Pflanzensaft saugende Insekten als Vektor nutzt (Hogenhout *et al.* 2008, Thebaud *et al.* 2008, Fletcher *et al.* 1998, Moya-Raygoza und Nault 1998).

*Burkholderia* (Burkholderiales machen in fast allen Proben den größten Teil der  $\beta$ -Proteobacteria-tRF-Muster aus) wurde bereits aus den Pilzgärten der Blattschneideameisenart *Atta sexdens rubropilosa* als Antibiotika produzierender Keim isoliert (Santos *et al.* 2004).

Auch in *Tetraponera* konnte die Gattung *Burkholderia* nachgewiesen werden (Van Borm *et al.* 2002b). *Burkholderia*, Actinomyceten, die ebenfalls in allen Ameisenproben der vorliegenden Studie vertreten waren, und andere Antimikrobia und Antibiotika produzierende Mikroorganismen dürften für alle eusozialen Insekten eine wichtige Rolle in der Prävention gegen pathogene Mikroorganismen spielen, da die Ausbreitung von Infektionen in Kolonien eusozialer Arten ein permanentes Risiko darstellt (Currie *et al.* 2006b, Little und Currie 2008, Little und Currie 2007, Taerum *et al.* 2007, Little *et al.* 2006, Currie *et al.* 2006a, Poulsen *et al.* 2005, Cafaro und Currie 2005, Currie *et al.* 2003). Keime, die deutliche Hemmhöfe (gehemmt wurden andere Bakterienkolonien) auf KB-Kulturplatten erzeugten, konnten auch in dieser Studie bei Kultivierungsexperimenten in Mexiko nachgewiesen werden (*Burkholderia*: EU842087, EU842097).

Die Gegenwart der Gruppen Lactobacillales (*Weissella*), Enterobacteriales, Bacillales, Bifidobacteriales und Clostridiales deutet auf fermentative Prozesse im Ameisendarm hin (Cai *et al.* 1998). Aus anderen Hymenopteren wie Bienen sind diese Gruppen bereits bekannt (Kacaniova *et al.* 2004). Über Aktivitäten bzw. Substratpräferenzen der aus den Ameisenarten *P. ferrugineus* und *P. gracilis* isolierten und kultivierbaren Mikroorganismen können Rückschlüsse aus der CFU-Auswertung gezogen werden. Die hier verwendeten Medien zeigten tendenziell Unterschiede zwischen den aus *P. ferrugineus* und *P. gracilis* gewonnenen Keimen auf. Das KB-Medium weist einen hohen Anteil Aminosäuren bzw. kurze Peptide auf, wogegen die anderen drei Medien arm an Aminosäuren, Peptiden und Proteinen sind und hauptsächlich die Saccharide Mannit, Saccharose oder Glucose-Fructose beinhalten. Die (tendenziell) höchsten CFU-Zahlen erlangte man mit dem KB-Medium mit Mikroorganismen, die aus Larven von *P. gracilis* isoliert worden waren. Dagegen ergaben sich bei allen zuckerbasierten Medien tendenziell die höchsten CFU-Zahlen pro g Frischgewicht Larven von *P. ferrugineus*. Dies spiegelt prinzipiell die Ernährung der beiden Ameisenarten wider, da *P. gracilis* zusätzlich zur FK und EFN auch tierische Nahrung verwertet, was bei *P. ferrugineus* nicht der Fall ist (Clement *et al.* 2008). Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über putative Funktionen der mit den Ameisen assoziierten Bakterien.

#### 4.1.5 Hinweise auf putativ N-fixierende Bakterien

Für Lebewesen verfügbarer Stickstoff in Form anorganischer Salze oder in organischen Molekülen ist eine limitierte Ressource der meisten terrestrischen und auch marinen Ökosysteme (Nardi *et al.* 2002, Capone 2001). Viele Schlüsselprozesse des Stickstoffkreislaufs werden allein durch z. T. sehr spezialisierte Bakterien katalysiert. Im

Kontext der vorliegenden Arbeit bedeutsam sind vor allem diazotrophe Prokaryoten, die molekularen Stickstoff zunächst als Ammonium und letztlich organischen Stickstoff in Aminosäuren (Glutamat und Glutamin, auch Asparagin) binden (Fritsche 1999). Sehr unterschiedliche Prokaryoten sind zur N-Fixierung fähig. Man findet sie sowohl bei den Bakterien als auch bei den Archaeen (Wolfe 2001). Trotz der systematischen Verschiedenheit der N-fixierenden Prokaryoten ist ihnen allen doch der Enzymkomplex Nitrogenase-Nitrogenasereduktase gemein.

Für alle drei untersuchten Ameisenarten konnten potenziell N-fixierende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Durch Kultivierungsverfahren konnten Enterobakterien der Gattungen *Pantoea* (Ladha und Reddy 2003, Ruppel und Merbach 1997, Ruppel und Merbach 1995, Loiret *et al.* 2004) und *Serratia* (Balachandar *et al.* 2006, Pan *et al.* 2002a) und Vertreter der Burkholderiaceae (Suarez-Moreno *et al.* 2008, Martinez-Aguilar *et al.* 2008, Tranvan *et al.* 1994) aus den Ameisen isoliert werden. Neben diesen Isolaten konnten weitere potenziell N-fixierende Vertreter der Rhizobiales, Rhodospirillales (verwandt mit der Gattung *Gluconacetobacter*, von der mittlerweile mehrere N-fixierende Isolate bekannt sind (Fuentes-Ramirez *et al.* 2001, Dutta und Gachhui 2007, Dutta und Gachhui 2006, Emtiazi *et al.* 2003)), Pseudomonadales, Spirochaeta und Cyanobacteria mittels der tRFLP-Methode nachgewiesen werden. Insbesondere die Gegenwart der potenziell N-fixierenden Enterobakterien *Pantoea* und *Serratia* in den Ameisen konnte zweifelsfrei über tRFLP-Analyse, 16S rDNA-Klonbibliothek und Kultivierungsverfahren dargelegt werden (Tabellen 3.2.1 und 4.4.1). Auch die aus Termiten bekannten Spirochaeten (*Treponema*, *Leptospira*) konnten mit der tRFLP-Methode in allen für diese Studie untersuchten Ameisenproben detektiert werden.

Die Freisetzung von Ethen beim Ethinreduktionsversuch aus Arbeiterinnen und Larven *P. gracilis* und *P. salvini* deutete tatsächlich auf Nitrogenaseaktivität hin (Tabelle 3.8 und Abbildung 3.26). Auch für einige Arbeiterinnen der noch nicht näher bestimmten, mutmaßlich generalistisch lebenden *Pseudomyrmex* sp. PSW06 konnte Ethenfreisetzung nachgewiesen werden. Eine Ethenproduktion bei Arbeiterinnen oder Larven der mutualistischen Arten *P. ferrugineus* und *P. peper*i konnte bislang nicht gezeigt werden.

**Tabelle 4.1: Habitate, Symbiosen und putative Funktionen der Bakterientaxa**

Habitate, Symbiosen und putative Funktionen der Bakterientaxa, die als mit *Pseudomyrmex* assoziiert nachgewiesen wurden. Alle Informationen wurden den angegebenen Literaturquellen entnommen. Vergleiche mit Tabelle 3.4: TReFID - Beste Treffer *Pseudomyrmex ferrugineus*.

Ordnungen	Gattungen	Habitat	Bekannte Symbiose mit	Putative Funktion	Literaturquelle
<b>Actino-mycetales</b>	<i>Actinomyces</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Streptomyces</i>	Boden	Ameisen: Attini	Produktion antimikrobieller Substanzen	(Currie <i>et al.</i> 2006a)
<b>Rhizobiales</b>	<i>Afipia</i>	Tiere	Katzen	Pathogen	(Zannolli und Morgese 1995)
	<i>Azorhizobium</i>	Pflanzen	Leguminosen	N-Fixierung	(Dreyfus <i>et al.</i> 1988)
	<i>Bartonella</i>	Tiere	Ameisen: <i>Tetraponera</i>	Unklar Pathogen?	(Stoll <i>et al.</i> 2007)
	<i>Bosea</i>		Unbekannt	Pathogen?	(La Scola <i>et al.</i> 2003)
	<i>Bradyrhizobium</i>	Pflanzen	Leguminosen	N-Fixierung	(Jordan 1982)
	<i>Devosia</i>	Pflanzen	Leguminosen	N-Fixierung	(Rivas <i>et al.</i> 2003)
	<i>Ensifer</i>	Pflanzen	Leguminosen	N-Fixierung	(Casida 1982)
	<i>Fulvimarina</i>	Marin	Unbekannt	Unbekannt	(Cho und Giovannonio 2003)
	<i>Hyphomicrobium</i>	Boden, Wasser	Unbekannt	Unbekannt	(Attwood und Harder 1972)
	<i>Mesorhizobium</i>	Pflanzen	Leguminosen	N-Fixierung	(Jarvis <i>et al.</i> 1997)
	<i>Ochrobactrum</i>	Pflanzen, Tiere	Unklar	Pathogen?	(Tripathi <i>et al.</i> 2006)
<b>Rhodo-spirillales</b>	<i>Acetobacter</i>	Boden, Wasser	Unbekannt	Unbekannt	(Jang und Chan 1993)
	<i>Azospirillum</i>	Boden, Wasser, Pflanzen	Poaceae und andere Pflanzen	N-Fixierung	(James und Olivares 1998)
	<i>Swaminathania</i>	Pflanzen	Poaceae	N-Fixierung	(Loganathan und Nair 2004)
<b>Rickettsiales</b>	<i>Anaplasma</i>	Tiere	Säugetiere, Milben	Pathogen	(Dumler <i>et al.</i> 2005)
	<i>Neorickettsia</i>	Tiere	Säugetiere	Pathogen	(Park <i>et al.</i> 2003)
	<i>Rickettsia</i>	Pflanzen, Tiere	Diverse Tiere	Pathogen	(Oneill <i>et al.</i> 1992)

	<i>Wolbachia</i>	Tiere	Insekten, Spinnentiere, Nematoden	Unklar, Pathogen ( <i>Tetraponera</i> )	(Stoll <i>et al.</i> 2007)
<b>Burkholderiales</b>	<i>Achromobacter</i>	Boden, Tiere	Nematoden		(Poinar und Thomas 1966)
	<i>Acidovorax</i>	Pflanzen	Pflanzen	Pathogen	(Willems <i>et al.</i> 1990)
	<i>Burkholderia</i>	Tiere	Ameisen: <i>Atta</i> , <i>Tetraponera</i>	Antibiotika- Produktion	(Kikuchi <i>et al.</i> 2005, Santos <i>et al.</i> 2004, Van Borm <i>et al.</i> 2002a, Van Borm <i>et al.</i> 2002b)
	<i>Comamonas</i>	Ubiquitär	Termiten	Unklar	(Kuhnigk <i>et al.</i> 1994b)
	<i>Cupriavidus</i>	Ubiquitär	Unbekannt	Unbekannt	(Makkar und Casida 1987)
	<i>Delftia</i>	Ubiquitär	<i>Ixodes</i> , Bienen	Unbekannt	(Benson <i>et al.</i> 2004, Mohr und Tebbe 2007)
<b>Neisseriales</b>	<i>Laribacter</i>	Tiere	Mensch	Pathogen	(Yuen <i>et al.</i> 2001)
<b>Pseudo- monadales</b>	<i>Acinetobacter</i>	Ubiquitär	Mensch, Insekten	Pathogen	(Srámová H 1992)
	<i>Pseudomonas</i>	Ubiquitär, Tiere, Pflanzen	<i>Tetraponera</i>	Unbekannt	(Van Borm <i>et al.</i> 2002b)
<b>Oceano- spirillales</b>		Ubiquitär	Unbekannt	Unbekannt	(Garrity 2005)
<b>Xantho- monadales</b>	<i>Zooshikella</i>	Watt	Unbekannt	Unbekannt	(Yi <i>et al.</i> 2003)
<b>Entero- bacteriales</b>	<i>Buchnera</i>	Insekten	Aphiden	N-Recycling	(Douglas 1998)
	<i>Enterobacter</i>	Tiere	<i>Tetraponera</i>	Unklar	(Stoll <i>et al.</i> 2007)

## 4.2 Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

### 4.2.1 Gemeinsamkeiten von Ameisen und Termiten

In mikrobiologischer Hinsicht verhältnismäßig gut untersucht sind die Termiten (Isoptera), deren dicht mit Mikroorganismen besiedelter Hinterdarm schon früh das Interesse der Forscher auf sich zog (French *et al.* 1976, Breznak *et al.* 1973, Benemann 1973). Dennoch werden auch hier immer wieder neue Aspekte der mikrobiellen Biozönose (als solche kann man den Termitendarm tatsächlich bezeichnen) durch regelmäßige Neubeschreibungen aufgedeckt (Droge *et al.* 2008, Kohler *et al.* 2008, Pittman *et al.* 2008, König *et al.* 2007, Frohlich *et al.* 2007, Droge *et al.* 2006, Li *et al.* 2003, Bakalidou *et al.* 2002, Wenzel *et al.* 2002, Shinzato *et al.* 2007). Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über die wesentlichen Gruppen prokaryotischen Lebens, die seit den 1970er Jahren als Bewohner des Hinterdarms verschiedener Termitenarten beschrieben wurden. Bei der komplexen mikrobiellen Gesellschaft im Termitendarm handelt es sich um eine außergewöhnliche Anpassung an eine besonders einseitige, nährstoffarme Diät, die aus Holz, verrottendem pflanzlichen Material oder Erde besteht (König *et al.* 1999). tRFLP-Untersuchungen einzelner Termitenarten zeigen, dass diese enorme Diversität in einzelnen Individuen simultan vertreten sein kann (MacKenzie *et al.* 2007, Shinzato *et al.* 2007). Vor diesem Hintergrund erscheint die große mikrobielle Diversität, die in der vorliegenden Studie bei Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* detektiert wurde, nicht unwahrscheinlich. Wie im Termitendarm rekrutierten sich die Bakterien des Ameisendarms aus den Gruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -Proteobakterien, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres-Acidobacteria-Gruppe und Archaeen. Zwischen Termiten und den hier untersuchten *Pseudomyrmex*-Arten gab es sogar große Übereinstimmungen bis auf das Gattungsniveau (Tabelle 4.2 im Vergleich zum Ergebnisteil). Das tRFLP-Massenscreening mit TReFID der mit arborealen Ameisen assoziierten Bakteriengemeinschaft erwies sich damit als erster Ausblick auf eine bislang verborgene mikrobielle Diversität.

Aufgrund der z. T. sehr stickstoffarmen Diät vieler Arthropoden mit einem C:N (Kohlenstoff zu Stickstoff)-Verhältnis von mitunter 1000:1 wurde schon früh über die Möglichkeit von Symbiosen zwischen Arthropoden und N-fixierenden Bakterien spekuliert (Buchner 1965, Wigglesworth 1972). Bei einigen Termitengattungen konnte erstmalig N-Fixierung von Bakterien in Insekten nachgewiesen werden (French *et al.* 1976, Breznak *et al.* 1973, Benemann 1973). Bei der genauen Untersuchung der Biozönose des Hinterdarms

wurden bislang eine Vielzahl verschiedener (potenziell) N-fixierender Bakterien u. a. aus den Gattungen *Citrobacter* (Enterobacteriaceae) (French *et al.* 1976), *Enterobacter* (*E. agglomerans* = *Pantoea agglomerans*; Enterobacteriaceae) (Potrikus und Breznak 1977), *Desulfovibrio* (Desulfovibrionaceae) (Frohlich *et al.* 1999, Kuhnigk *et al.* 1996), *Clostridium* (Clostridiaceae), *Treponema* (Spirochaeten) (Breznak 2002, Ohkuma *et al.* 1999a) sowie diversen methanogenen Archaeen (Ohkuma *et al.* 1999c, Ohkuma *et al.* 1999b) gefunden (Tabelle 4.1). Dieses Profil ähnelt sehr stark der Bakteriengemeinschaft, die bei den untersuchten *Pseudomyrmex*-Arten nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3.4). Neben Termiten sind Ameisen weitere Kandidaten für bislang unvermutete N-fixierende Bakteriengesellschaften. Sie stellen einen Großteil der tierischen Biomasse in tropischen Regenwäldern dar (Davidson 1997, Tobin 1995) und Untersuchungen des N-Isotopenverhältnis frei lebender, tropischer, Baum bewohnender Ameisen weisen stark auf „alternative“ Stickstoffquellen bei diesen Ameisen hin, die bis dahin für primär räuberisch gehalten wurden (Davidson *et al.* 2003). Für die Ameisengattung *Tetraponera* konnte erstmalig die Präsenz potenziell N-fixierender Bakterien im Ameisendarm nachweisen (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b). Unter anderem konnten die Bakteriengattungen *Flavobacteria*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Bartonella*, *Pantoea* und *Pseudomonas* in *Tetraponera* nachgewiesen werden (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b). Der direkte Nachweis der N-Fixierung konnte jedoch nicht erbracht werden. *Pantoea* konnte mit dieser Arbeit nun auch in *P. ferrugineus* und *P. gracilis* nachgewiesen werden.

Doch was macht die Lebensweise tropischer Baum bewohnender Ameisen jener der Termiten so ähnlich, dass die Bakteriengemeinschaft beider Insekten sich so weit gehend gleicht? Die Hauptnahrungsquellen vieler tropischer Ameisen bestehen aus stickstoffarmen Pflanzensäften, extrafloralem Nektar (EFN) und Honigtau (zuckrige Ausscheidungen der Pflanzensaft saugenden Insekten wie Aphiden und Cocciden) (Stadler und Dixon 2005, Woodring *et al.* 2004, Blüthgen *et al.* 2004a, Blüthgen und Fiedler 2004, Iglesias *et al.* 2004, Yao und Akimoto 2002, Byrne und Miller 1990, Ziegler und Pent 1977). Bei Ameisen, die sich karnivor ernähren, kann von einem C:N-Verhältnis in der Nahrung von etwa 3,7:1 ausgegangen werden. Für Honigtau lies sich ein C:N-Verhältnis von durchschnittlich 66,6:1 anhand von Literaturangaben errechnen (Woodring *et al.* 2004). Im EFN, dessen lösliche Bestandteile ebenfalls zum größten Teil Saccharide darstellen, können ähnliche Verhältnisse ermittelt werden (Heil *et al.* 2005b, Heil *et al.* 2004b). Ausgehend von Daten zur Protein-, Aminosäure- und Zuckerkonzentration, die von M. Gonzalez-Teuber im Rahmen des



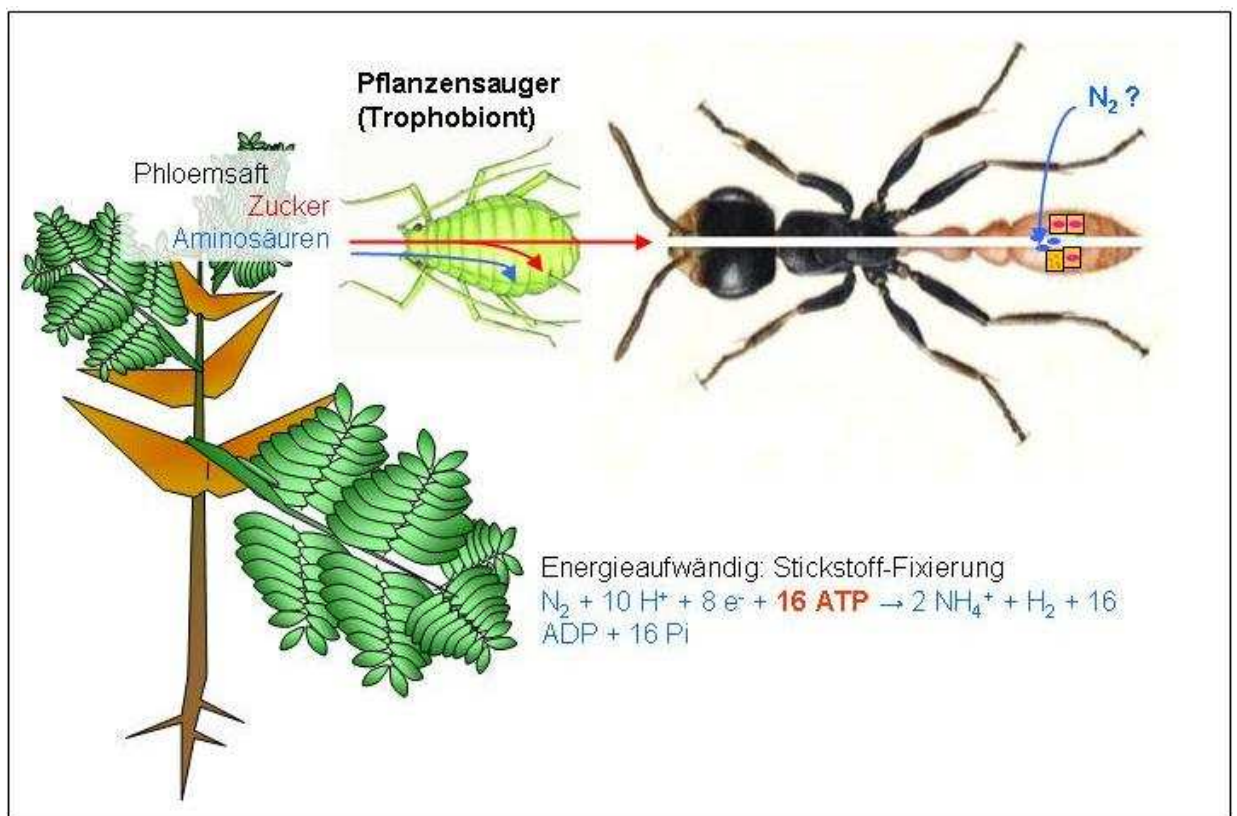
Forschungsprojektes der Arbeitsgruppe gesammelt wurden, konnten für den extrafloralen Nektar von *Acacia cornigera* (Myrmekophyt) ein relatives C:N-Verhältnis von 109:1, von *A. hindsii* (Myrmekophyt) ein C:N-Verhältnis von 49:1, von *A. farnesiana* (myrmekophil) ein C:N-Verhältnis von 197:1 und von *Prosopis juliflora* (myrmekophil) ein C:N-Verhältnis von 400:1 kalkuliert werden (Gonzalez-Teuber und Heil submitted). Diese Daten weisen den myrmekophilen Pflanzen zwar ein ernährungsphysiologisch ungünstigeres C:N-Verhältnis des extrafloralen Nektars von 200:1 bis 400:1 aus, aber die Werte für die beiden untersuchten Myrmekophyten sind nur unwesentlich günstiger. Diese C:N-Verhältnisse im EFN reichen damit noch nicht oder nur knapp an Termitennahrung mit einem C:N-Verhältnis von ca. 500:1 (Benemann 1973) heran. Die Zusammensetzung der Futterkörperchen (*food bodies*, Belt'sche-Körperchen) – der anderen wichtigen Nahrungsquelle mutualistischer Akazienameisen – spiegelt mit ihrem hohen Proteingehalt (C:N-Verhältnis zwischen 4,6:1 bis 4,9:1) die Bedürfnisse karnivorer Ameisen wieder (Heil *et al.* 2004a). Wie phylogenetische Studien zeigten, sind Ameisen ancestral Prädatoren und nur einige Gruppen innerhalb der Ameisen wurden sekundär herbivor (Moreau *et al.* 2006). Mit den Futterkörperchen der Akazien werden Larven und die Königinnen gefüttert (Janzen 1966, Janzen 1967). Mutualistische *Pseudomyrmex*-Arten (wie *P. ferrugineus*) leben allein von EFN und Futterkörperchen ihrer Wirtsakazien (Janzen 1967, Heil *et al.* 2004a, Clement *et al.* 2008, Janzen 1966). Dagegen sammeln opportunistische Akazienparasiten wie *P. gracilis* und Baum bewohnende, nicht mit Pflanzen eng assoziierte Ameisen der Gattung wie *P. salvini* (auch) andere Nahrung wie tote Insekten und Honigtau (Clement *et al.* 2008, Eilmus 2008). Nahrungsquellen, wie z. B. tote Insekten, stellen jedoch keine kontinuierlich verfügbare Protein- und damit N-Quelle dar. Der besondere Stickstoffbedarf der Insekten erwächst zudem aus der Zusammensetzung des Insekteninteguments, das sich primär aus dem stickstoffhaltigen Polymer Chitin (N-Acetylglucosamin) und Strukturproteinen (Sklerotin) zusammensetzt (Dettner und Peters 1999). Eine zusätzliche oder alternative N-Quelle könnte wie bei vielen Termiten auch für die hier untersuchten Ameisen ob Mutualisten oder Opportunisten von großem Vorteil sein. Ob etwa die alleinige N-Versorgung durch die Wirtspflanze den großen und rasch wachsenden Kolonien der mutualistischen Akazienameisen (Janzen 1967) genügt, ist fraglich. Damit scheint es erhebliche Gemeinsamkeiten im Bereich der Ernährung zwischen den untersuchten Baum bewohnenden Ameisen und Termiten zu geben. Eine N-recyclende oder N-fixierende Darmflora wäre eine effektive Anpassung an eine stickstoffärmere Kost und könnte zumindest teilweise die hohe ökologische Abundanz von – insbesondere Baum bewohnenden – Ameisen erklären

(Davidson und Patrell-Kim 1996, Davidson *et al.* 2003, Davidson *et al.* 2006). Beide Diäten sind sehr kohlenhydratreich und relativ arm an organischen Stickstoffverbindungen. Während die Nahrungsquellen der Ameisen (Honigtau, EFN und food bodies) jedoch sehr leicht verdaulich, ja sogar regelrecht vorverdaut sind (Heil *et al.* 2005b, Heil *et al.* 2005a), bedürfen die Termiten bei ihrer schwerverdaulichen Kost (Cellulose, Lignin u. a.) die Hilfe spezieller Mikroorganismen mit entsprechender Enzymausstattung (König 2006, Kuhnigk *et al.* 1994b, Bakalidou *et al.* 2002, Wenzel *et al.* 2002, Kuhnigk und König 1997, Schäfer *et al.* 1996, Varma *et al.* 1994, Kuhnigk *et al.* 1994a, Kato *et al.* 1998, Brune 1998, Itakura *et al.* 1995). Die Fermentation der Monosaccharide, N-Fixierung und N-Recycling, Aminosäuren- und Kofaktorensynthese könnte jedoch ausgehend von den Profilen der Prokaryotengemeinschaften in beiden Insektengruppen sehr ähnlich ablaufen. Doch nicht allen Prokaryonten-Gruppen können auf diese Weise Funktionen zugewiesen werden. So konnte bislang keine Erklärung für das Auftreten von tRF-Mustern gegeben werden, die sich deutlich Cyanobakterien zuordnen lassen. Diese sind als N-fixierende Symbionten einiger Pflanzen und Flechten bekannt (Adams und Duggan 2008, Usher *et al.* 2007, Kneip *et al.* 2007, O'Brien *et al.* 2005, Trench 1993, Peters 1991), jedoch bislang nicht bei terrestrischen Tieren, sondern nur über einige marine Invertebraten dokumentiert (Usher *et al.* 2007, Sara *et al.* 1998, Trench 1993). Nahe liegend ist die Vermutung, dass die detektierten tRF-Muster, die für das Auftreten von Cyanobakterien sprechen, auf (Oberflächen-) Kontaminationen der Ameisen zurückzuführen waren. Da im Vorfeld der Forschungsreise nach Mexiko bereits Hinweise auf Cyanobakterien vorlagen, wurde auch ein spezielles Kulturmedium (BG-11) eingesetzt (Allen und Stanier 1968). Nach mehreren Wochen war ein minimales Wachstum in Form fädiger Strukturen erkennbar. Die aus Mexiko nach Deutschland überführten Proben zeigten jedoch keinerlei Wachstum mehr und die fädigen Strukturen waren nicht mehr erkennbar.

Zur potenziell N-fixierenden Darmflora anderer Arthropoden liegen dagegen nur wenige Untersuchungen vor. So konnte etwa für eine mediterrane Fruchtfliegenspezies (Behar *et al.* 2005) und bei einigen Käfern (Kuranouchi *et al.* 2006) mittels Ethin-Reduktionstest Nitrogenaseaktivität nachgewiesen werden (Hardy *et al.* 1968, Hardy *et al.* 1973). Bei verschiedenen Bodenarthropoden konnte mittels Antikörpermarkierung das Vorhandensein der Nitrogenase in Darmpräparaten nachgewiesen werden (Nardi *et al.* 2002).

#### 4.2.2 Vorteile durch N-Fixierung bei Baum bewohnenden Ameisen

Baum bewohnende Arten wie *Pseudomyrmex salvinii* würden durch N-Recycling und N-Fixierung ihre Kost erheblich aufwerten. Generell zeigt das Paradoxon, dass mehr Ameisen als potenzielle Beutetiere vorhanden sind (Davidson 1997, Davidson und Patrell-Kim 1996, Tobin 1995), dass viele Ameisen sich nicht, oder nicht überwiegend räuberisch ernähren können. In der Tat belegten Untersuchungen des  $\delta^{15}\text{N}$ -Verhältnis von Ameisen aus dem Amazonasgebiet und von Borneo, dass viele arboreale Ameisenarten nur wenig Stickstoff aus tierischer Kost beziehen (Davidson *et al.* 2003, Davidson 1997, Davidson und Patrell-Kim 1996, Tobin 1995). Da diese Nahrungsquellen zwar sehr energiereich, dafür allerdings N-arm sind, können mutualistische Bakterien, die Stickstoff recyceln oder fixieren und ihre Wirtsameisen so zumindest bis zu einem gewissen Maße von der Notwendigkeit des Sammelns tierischer Biomasse unabhängig machen, einen erheblichen Konkurrenzvorteil für ihren Wirt bedeuten.



**Abbildung 4.1: Modellvorstellung Baum bewohnende Trophobionten-abhängige Ameise unter Einbeziehung möglicher N-Fixierung**

Viele Baum bewohnende Ameisen bestreiten einen Großteil ihrer Ernährung aus dem Sammeln von Honigtau, der von Pflanzensaugern wie Blatt- und Schildläusen ausgeschieden wird (Blüthgen *et al.* 2000, Davidson und Patrell-Kim 1996). Die Pflanzensauger ernähren sich von Phloemsaft, den sie in großen Mengen konsumieren um genügend Aminosäuren aus dem pflanzlichen Wirt beziehen zu können. Der Honigtau enthält daher zwar noch einen großen Anteil Saccharide, ist aber relativ arm an Aminosäuren (Woodring *et al.* 2004,

Blüthgen *et al.* 2004a). Die Saccharide würden jedoch eine günstige Energiequelle für die energieaufwändige N-Fixierung potenziell N-fixierender Bakterien liefern.

---

#### 4.2.3 Vorteile durch N-Fixierung für obligate Akazienameisen

Geht man von der Möglichkeit aus, dass die Darmflora der Akazienameisen Stickstoff fixiert, ergeben sich folgende Überlegungen: In diesem Falle würden die Investitionen der Akazie den laufenden Stickstoffbedarf der Kolonie nicht dauerhaft oder zumindest nur zeitweilig decken (Minimierung des Aufwands zur Etablierung und Stabilisierung des Mutualismus). Die Ameisen wären durch die eigene Fixierungsaktivität ihrer Darmflora unabhängiger von der Versorgung durch die Pflanze mit Stickstoff und könnten auch Phasen überleben, in denen die Pflanze z. B. durch Trockenstress keine Futterkörperchen in hinreichender Zahl bilden kann. Hätten die Ameisen die Fähigkeit zur N-Fixierung mitgebracht, ist jedoch nicht ganz verständlich, warum die Akazien überhaupt Futterkörperchen entwickelt haben, die durch einen hohen Gehalt an Protein und Lipiden hervorragend auf die Bedürfnisse der Ameisen zugeschnitten zu sein scheinen (Heil *et al.* 2004a). Von der oben bereits angesprochenen reinen Quantität (Futterkörperchen- und damit Proteinmenge) abgesehen, kann also auch die Qualität der angebotenen Stickstoffverbindungen eine Rolle spielen. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass von acht für Tiere essentiellen Aminosäuren nur Leucin, Lysin und Arginin in den Futterkörperchen vorhanden sind (Heil *et al.* 2004a). Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen der Untersuchung (Ethin-Reduktion,  $^{15}\text{N}_2$ -Versuch) bei *P. ferrugineus* konnte jedoch eine N-Fixierungsaktivität trotz Gegenwart entsprechender Bakteriengattungen bisher nicht bestätigt werden. Die Darmflora der Mutualisten kann daher andere Funktionen wie die Bereicherung der Nahrung durch Synthese oder Recycling essentieller Aminosäuren (welche in den Futterkörpern fehlen oder nur in geringer Konzentration vorhanden sind) oder vielleicht auch die Synthese von Komponenten oder Vorstufen des *Pseudomyrmex*-Giftes haben.

#### 4.2.4 Wurzelknöllchensymbiosen der Ameisenakazien

Wie viele Angehörige der großen Gruppe Fabales gehen auch Akazien Symbiosen mit bestimmten Bodenbakterien der Gruppe Rhizobiales ein (Lloret *et al.* 2007, Ovalle *et al.* 1996, Aronson *et al.* 1992, Hansen *et al.* 1987), was ihnen die Fixierung atmosphärischen Stickstoffs ermöglicht. Von dieser Stickstoffversorgung profitieren auch die Akazienameisen, da die Wirtspflanze Protein- und damit N-reiche Futterkörper (C:N-Verhältnis zwischen 4,6:1

bis 4,9:1) produziert (Heil *et al.* 2004a), welche neben den Aminosäuren und Proteinen im EFN der Akazien die einzige N-Quelle für die mutualistischen Ameisen darstellen (Clement *et al.* 2008). Diese Knöllchenbakterien waren daher auch für diese Untersuchung interessant, da sie zur Ernährung der Ameisenkolonien beitragen. Die isolierten Knöllchenbakterien ließen sich drei Gattungen zuordnen: *Rhizobium*, *Ensifer* (= *Sinorhizobium*) und *Mesorhizobium*. Bislang liegen zwei Untersuchungen über die Identität der Akazien nodulierenden Rhizobiales des mesoamerikanischen Florenbereichs vor (Lloret *et al.* 2007, Toledo *et al.* 2003). Erst kürzlich neu beschrieben und veröffentlicht wurde *Ensifer mexicanus* als Symbiont von *Acacia angustissima* (Lloret *et al.* 2007). *Ensifer* wurde ursprünglich als „räuberisches“ Bodenbakterium beschrieben (Casida 1982). Erst später wurden nodulierende Isolate entdeckt bzw. erzeugt (Rogel *et al.* 2001, Toledo *et al.* 2003). Wegen der erheblichen genetischen Ähnlichkeit zu *Sinorhizobium* wird derzeit vielfach vorgeschlagen *Sinorhizobium* in *Ensifer* umzuwandeln – zumal die Erstbeschreibung der Gattung *Ensifer* bereits 1982 (Casida) gegenüber *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988 *emend.* De Lajudie *et al.* 1994 erfolgte (Young 2003). Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten über die Identität der bakteriellen Symbionten der untersuchten Akazien sind die ersten dieser Art für die genannten Spezies.

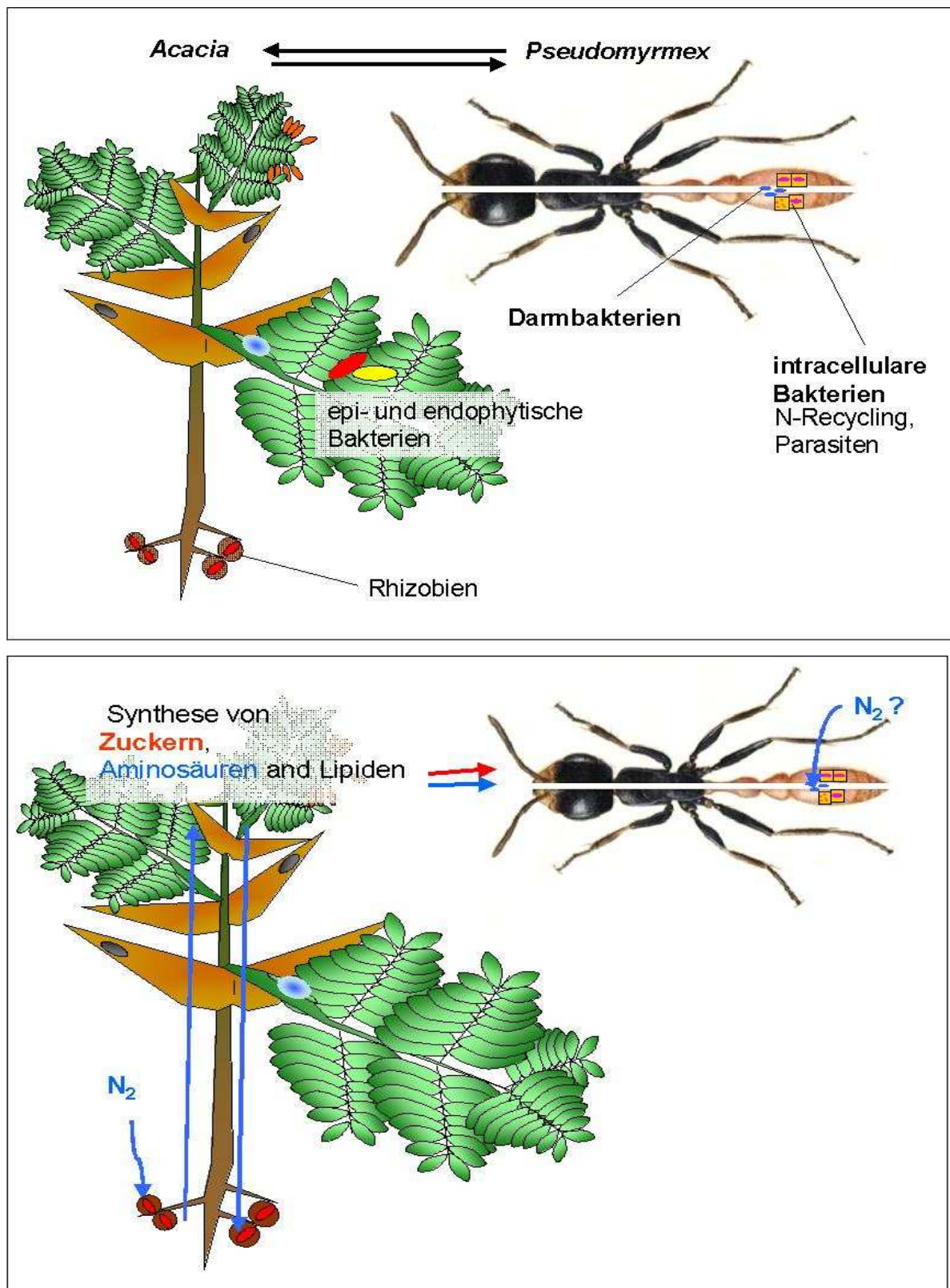
**Tabelle 4.2: Termitendarmflora.**

Zusammenstellung der Prokaryoten, die seit den 1970iger Jahren aus verschiedenen Termitenarten beschrieben wurden. Diese Aufzählung ist nicht vollständig, da nicht alle Literaturquellen verfügbar waren. \*)Abbau: Vereinfachung: Abbau von komplexen Kohlenhydraten, Aromaten usw.

Taxonomische Einordnung		Gattung & Art	Funktion und Literaturquelle	
<b>γ-Proteobacteria</b>	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter (Pantoea) agglomerans</i>	N-Fixierung	(Potrikus und Breznak 1977)
		<i>Serratia marcescens</i>	Abbau*	(Varma <i>et al.</i> 1994, Adams und Boopathy 2005)
		<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994) (Schäfer <i>et al.</i> 1996)
	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994, Schäfer <i>et al.</i> 1996)
	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
<b>β-Proteobacteria</b>	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes sp.</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Burkholderiales	<i>Comamonas (Delftia) acidotrans</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Comamonadaceae			

	Neisseriaceae	<i>Stenoxybacter acetivorans</i>	Acetat-Oxidation	(Wertz und Breznak 2007)
<b>α-Proteobacteria</b>	Rhizobiales	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Brucellaceae			
	Rhizobiales	<i>Agrobacterium</i>		(Wenzel <i>et al.</i> 2002)
	Rhizobiaceae	<i>Afipia</i>		
	Bradyrhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>		
	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>		(Wenzel <i>et al.</i> 2002)
	Rhizobiaceae	<i>Ensifer sp.</i>	N-Fixierung	(Frohlich <i>et al.</i> 2007)
<b>δ-Proteobacteria</b>	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio D. intestinalis</i>	Sulfat Reduktion, (N-Fixierung?)	(Kuhnigk <i>et al.</i> 1996, Ohkuma <i>et al.</i> 1996, Droge <i>et al.</i> 2005)
<b>Actinobacteria</b>	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas sp.</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter sp.</i>	Abbau	
	Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	Abbau	
	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	Abbau	
	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994, Schäfer <i>et al.</i> 1996)
	Microbacteriaceae	<i>Aureobacterium liquefaciens</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Nocardiaceae	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Abbau	(Chung <i>et al.</i> 1994)
<b>Firmicutes</b>	Clostridiaceae	<i>Clostridium sp. C. mayombeii</i>	Fermentation, (N-Fixierung?)	(Kane <i>et al.</i> 1991, Ohkuma <i>et al.</i> 1996, Ohkuma <i>et al.</i> 1999b)
		<i>Sporomusa termitida</i>	Fermentation	(Breznak und Blum 1991)
	Bacillaceae	<i>Bacillus sp. Bacillus therrnoalkalophilus</i>	Abbau Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994, König 2006)
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Abbau	
	Listeriaceae	<i>Listeria innocua</i>	Abbau	
<b>Planctomycetes</b>			(Kohler <i>et al.</i> 2008)	
<b>Bacteroidetes</b>	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides sp.</i>	Abbau	(Varma <i>et al.</i> 1994)
	Sphingobacteriales;	<i>Spirosoma sp.</i>		(Wenzel <i>et al.</i> 2002)
	Flexibacteraceae			
	Bacteroidales	„ <i>Vestibaculum illigatum</i> “		(Stingl <i>et al.</i> 2004)
		Bacteroidales-endosymbiont	N-Fixierung, N-Recycling, Synthese von Aminosäuren und CoFaktor	(Hongoh <i>et al.</i> 2008b)

<b>Spirochaetes</b>	Spirochaetaceae	<i>Treponema sp.</i> <i>Spirochaeta</i> <i>coccoides</i>	N-Fixierung; (Ohkuma <i>et al.</i> 1999a, Iida <i>et al.</i> 2000, Breznak 2002, Adams und Boopathy 2005, Droge <i>et al.</i> 2006, Berlanga <i>et al.</i> 2007, König <i>et al.</i> 2007, Droge <i>et al.</i> 2008)
<b>Fibrobacteres-Acidobacteria-Gruppe</b>	Fibrobacteres		(Hongoh <i>et al.</i> 2006)
<b>Termite Group I (TG-1)</b>	'Endomicrobia'		(Ikeda-Ohtsubo <i>et al.</i> 2007, Herlemann <i>et al.</i> 2007, Ohkuma <i>et al.</i> 2007, Pittman <i>et al.</i> 2008, Hongoh <i>et al.</i> 2008a)
<b>Euryarchaeota:</b>	Methano- microbiales Methanosarcinales Methanobacteriales		(Miyata <i>et al.</i> 2007)
<b>Crenarchaeota</b>	Thermoplasmatales		
<b>Euryarchaeota</b>	Methano- bacteriaceae	<i>Methanobrevi- bacter</i>	(Leadbetter und Breznak 1996)
<b>tRFLP-Untersuchung</b>			
<b>Cytophaga-Flexibacter-Bacteriodes, Proteobacteria, Spirochetes, TM7-OP11, Gram-positive Bacteria</b>			(Mackenzie <i>et al.</i> 2007)



**Abbildung 4.2: Modellvorstellung des Ameise-Pflanze-Mutualismus unter Einbeziehung der Bakterien und (potenzieller) N-Fixierung**

Die Ameisenpflanze (hier das Beispiel *Acacia sp.*) und die Pflanzenameisen sind reich mit Mikroorganismen besiedelt. Als Leguminosen weisen die Akazien Wurzelknöllchen mit Rhizobien auf, die N fixieren können. Die Pflanze versorgt die Ameisen mit Futter in Form von EFN (extrafloraler Nektar an Nektardrüsen des Blattstiels) und lipid- sowie



proteinreichen Futterkörperchen (Belt'sche-Körperchen). Der saccharidreiche EFN könnte eine günstige Energiequelle für die energieaufwändige N-Fixierung potenziell N-fixierender Bakterien im Ameisendarm darstellen.

---

### **4.3 Beurteilung der experimentellen Verfahren**

Im nachfolgenden Abschnitt der Diskussion werden die angewandten Methoden anhand folgender Fragen kritisch diskutiert: Welche Probleme traten bei Standardmethoden auf? Eignete sich die tRFLP-Methode für die Untersuchung? Wie sind die Ergebnisse dieser und der weiteren Methode zu bewerten?

#### **4.3.1 DNA-Isolierung aus Ameisen**

Die Isolierung von Gesamt-DNA – einschließlich bakterieller Gesamt-DNA – aus den Ameisenproben aller untersuchten Arten stellte ein erhebliches Problem dar. Die verschiedenen Kits erbrachten qualitativ wie quantitativ sehr unterschiedliche Resultate, was jedoch vermutlich auf die Proben (Ameisenlarven und Ameisenarbeiterinnen) zurück zu führen war, da unterschiedlich vorbereitete/konservierte Ameisenproben eingesetzt werden mussten: Frische, lebendige Ameisen, tiefgefrorene und in 70 %igem Ethanol konservierte Proben. Darüber hinaus wurde versucht nur Teile der Arbeiterinnen zur Präparation einzusetzen, um Verunreinigungen durch Gift- und Speicheldrüsensekrete auszuschließen. Dennoch gelang eine zufrieden stellende DNA-Isolierung nur gelegentlich. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Ameisenproben Stoffe enthalten, die den Präparationsprozess stören. Es wäre möglich, dass der hohe Fettgewebeanteil der Larven oder Drüsensekrete wie das der Giftdrüsen oder generell Vorstufen der Giftsynthese in den Ameisen die Ursache für die mitunter schlechten Resultate darstellten (Pan *et al.* 2002b, Garraffo *et al.* 2001, Pan und Hink 2000, Braekman und Daloze 1996, Devijver *et al.* 1995, Hink *et al.* 1994, Merlin *et al.* 1988, Schultz *et al.* 1979, Schultz *et al.* 1978, Schultz und Arnold 1977).

#### **4.3.2 Reproduzierbarkeit der tRFLP-Methode**

Bei der Präparation lebender Ameisen für bakterielle Kultivierungsansätze wurde auf eine Oberflächensterilisation verzichtet, da beispielsweise von wichtigen bakteriellen Symbionten Pilz kultivierender Ameisen bekannt ist, dass diese auf dem Exoskelett der Ameisen wachsen (Currie *et al.* 2006a). Für die tRFLP-Analysen (DNA-Präparation) wurden

je nach Verfügbarkeit tiefgefrorene oder in 70 %igem Ethanol konservierte Ameisen herangezogen.

Obwohl viele (von anderen Tieren und vom Menschen bekannte) typische Darmbakterien einen großen Anteil der nachgewiesenen Mikroorganismen ausmachen, kann also nicht exakt determiniert werden, welche der Bakterien nun Endosymbionten darstellen und welche nicht. 99 % der Darmflora des Menschen setzen sich aus Firmicuten, Bacteroidetes, Proteobacteria und Actinobacteria (Eckburg und Relman 2007) zusammen. Nimmt man alle Proben der hier untersuchten Ameisenarten zusammen, machen diese vier Gruppen im Durchschnitt 83 % der Gesamtdiversität bei *Pseudomyrmex* aus. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mehrzahl der detektierten Keime aus der Darmflora rekrutiert, da auf sie der größte Anteil der mit einem Tier assoziierten bakteriellen Biomasse entfällt (Hinterdarmflora der Termiten (König *et al.* 1999); beim Menschen etwa zehnmal so viele Bakterienzellen wie menschliche Zellen (Wilson 2005)). Unabhängig davon zeigten alle Proben aus verschiedenen Kolonien drei verschiedener Ameisenarten sehr ähnliche mikrobielle Gesellschaftsprofile, was dafür spricht, dass die meisten dieser Bakterien verbreitet und dauerhaft mit diesen Ameisen assoziiert sind und damit als Symbionten bezeichnet werden können.

### 4.3.3 tRFLP-Methode und TReFID

Die enorme prokaryotische Diversität, die mit der hier angewandten tRFLP-Methode für Baum bewohnende Ameisen der Gattung *Pseudomyrmex* nachgewiesen wurde, muss in Anbetracht der relativ wenigen bislang aus Ameisen bekannten bakteriellen Taxa auch im Hinblick auf die gewählte Untersuchungsmethode kritisch diskutiert werden. Es gibt einige allgemeine Kritikpunkte an tRFLP-basierten Untersuchungsverfahren, die jedoch nicht alle auf die hier verwandte Methode angewandt werden können. tRFLP-Analysen von Bakteriengesellschaften wurden und werden in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eingesetzt, um Schwankungen der Populationszusammensetzung unter wechselnden Umweltbedingungen nachzuweisen (Wolsing und Prieme 2004, Ramirez-Moreno *et al.* 2003, Tun *et al.* 2002, Acinas *et al.* 1997). Dafür werden sehr oft die auftretenden Mengenproportionen der terminalen Restriktionsfragmente herangezogen. Da hierzu jedoch Produkte einer PCR verwandt werden, geben die tRF-Mengenproportionen viel weniger Schwankungen der Populationszusammensetzung als Variationen in der Amplifikation während der PCR und Primerpräferenzen wieder (Rösch *et al.* 2006, Schutte *et al.* 2008). Die Populationsanalyse mit TReFID berücksichtigt die Signalstärke einzelner

Restriktionsfragmente dagegen nicht, sondern nur deren Gegenwart oder Fehlen (Rösch und Bothe 2005, Eilmus *et al.* 2007). Eine quantitative Analyse ist mit TReFID also nur auf der Ebene der Diversität unterschiedlicher tRF-Muster möglich. Weitere prinzipielle Kritikpunkte betreffen die Auswahl der Primer und der Restriktionsenzyme. Je nachdem, ob eine spezielle bakterielle Gruppe oder die „Gesamtheit“ prokaryotischen Lebens in einer Probe analysiert werden sollen, fällt die Wahl auf mehr oder weniger spezifische oder universelle Primer. Die Primer ihrerseits gingen aber aus dem bereits vorhandenen Wissen um die Sequenzdiversität des Zielgens (meist 16S rRNA-Gen) hervor. Daher können meist nur (bekannte) Organismen (-gruppen) erfasst werden, für die diese Bereiche tatsächlich konserviert oder variabel sind (Schutte *et al.* 2008). Selbst „universelle“ Primer erfassen somit nur einen Teil der tatsächlichen Diversität. Im Falle der vorliegenden Methode fiel die Wahl auf möglichst universelle Primer, die nach wie vor für derartige Untersuchungen genutzt werden (Singh *et al.* 2006, Schutte *et al.* 2008, Rösch und Bothe 2005, Weisburg *et al.* 1991, Marchesi *et al.* 1998).

Zur Abschätzung der Reproduzierbarkeit wurde eine Ausgangsprobe (Larven von *P. ferrugineus*) insgesamt siebenmal auf identische Art und Weise in unabhängigen Durchgängen analysiert und die TReFID-Ergebnistabellen ausgewertet (siehe Abschnitt 3.3 Reproduzierbarkeit der tRFLP-Methode). Die Diversitätsprofile der sieben Analysen erwiesen sich als äußerst ähnlich und damit qualitativ reproduzierbar (Abbildung 3.19). Die absolute Anzahl der detektierten tRF-Muster schwankte zwar zwischen 2.555 und 8.169, auf dem Level der vorhandenen Taxa ergaben sich über die sieben Analysen hinweg jedoch sehr ähnliche Proportionen (Musterzahl pro Taxon im Verhältnis zur Gesamtzahl unterschiedlicher Muster pro Analyse). Qualitativ kann die Methode also als reproduzierbar gewertet werden. Wichtig dabei ist, dass diese Anteilsverhältnisse der verschiedenen Taxa nicht absolute Zellzahlen in einer Probe widerspiegeln, sondern nur zeigen, welche Gruppe diverser (also mit mehr unterschiedlichen tRF-Mustern) vertreten ist. Dies verdeutlichten auch die Ergebnisse aus der Überprüfung von TReFID (Abschnitt 3.4), bei der ein künstliches Gemisch aus drei Bakterienstämmen untersucht wurde. Dazu weiter unten mehr. Daher kann bei der hier verfolgten Methodik kein Diversitätsindex wie z. B. der SHANNON-Index (Shannon 1948) bestimmt werden, weil keine Daten zur relativen Häufigkeit einer einzelnen Art (Ribotyp) bezogen auf die Gesamtindividuenzahl ermittelt werden. Für die Bestimmung absoluter Anteile bestimmter Taxa auf Zellzahlniveau ist gegenwärtig wohl nur die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) praktikabel. Diese Methode ist jedoch hinsichtlich

des Einsatzes taxonspezifischer Sonden beschränkt und kann immer nur einen engen Ausschnitt der Diversität erfassen (Chae *et al.* 2008, Olsen *et al.* 2008, Friedrich *et al.* 1999, Kenzaka *et al.* 1998, Llobet-Brossa *et al.* 1998, Fischer *et al.* 1995).

Die Schwankungen der absoluten Anzahl der tRF-Muster zwischen den sieben verschiedenen Analysen sind auf die Fluoreszenzhelligkeit und damit auf die Konzentration der zur Fragmentanalyse eingesetzten Proben zurückzuführen. Bei insgesamt geringerer Konzentration markierter DNA-Fragmente verschwinden mengenmäßig schwach vertretene terminale Restriktionsfragmente im Hintergrundrauschen, so dass nur die starken Fragmentsignale zurück bleiben.

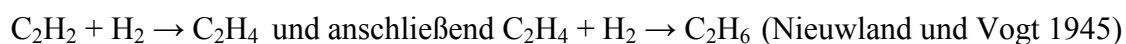
Zur Überprüfung der Funktion von TReFID in Kombination mit der seit Veröffentlichung (Rösch und Bothe 2005, Rösch *et al.* 2006) erweiterten Datenbank wurden Fragmentdatensätze einer künstlichen Mischung von *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense* und *Rhizobium leguminosarum* unter unterschiedlichen Programmeinstellungen analysiert (siehe TReFID-Überprüfung). Die Frage war hier, unter welchen Analysebedingungen (Fehlerspielraum der tRF-Peak Fragmentlängenbestimmung und Anzahl notwendiger Enzyme) möglichst exakte Ergebnisse zu erzielen sind. Der Anteil fälschlicherweise nachgewiesener Ordnungen beträgt bei bis vier verschiedenen Enzymen knapp 20 % der Treffer und nimmt auf knapp 4 % bei 11 bzw. 12 verschiedenen Enzymen ab (Abbildungen 3.23 und 3.24). Diese fehlerhaften Treffer könnten die Diversitätsuntersuchung verfälschen. Im konkreten Fall handelt es sich um zwei falsch identifizierte Muster von 47 Mustern insgesamt, welche 4 % ausmachen. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass taxonomisch fehlerhaft eingruppierte Referenzsequenzen der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zu Fehlidentifikationen führen, wurden die zugrunde liegenden Sequenzen mit dem Naive Bayesian classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) taxonomisch eingeordnet (Wang *et al.* 2007). Die Sequenzen konnten nur bis zur Stufe Proteobacteria sicher (100 %) zugeordnet werden. Aufgrund vieler solcher taxonomisch unsicherer Sequenzen wurde entschieden, für die tRFLP-Analyse der vorliegenden Arbeit nur dann Taxa als identifiziert/detektiert gelten zu lassen, wenn zumindest fünf unabhängige tRF-Muster die Gegenwart in der Probe bestätigen. Zudem wurden Datenbankeinträge von (exotischen bzw. seltenen) Bakteriengruppen, die nur mit wenigen Mustern repräsentiert wurden, taxonomisch überprüft.

Mittlerweile sind Verfahren wie das Anlegen von Klonbibliotheken zumindest in großen Laboren weitestgehend automatisiert, wodurch eine große Anzahl von Klonen erfasst werden kann. Auch Metagenomanalysen erlauben den umfassenden Einblick in artenreiche mikrobielle Gesellschaften (Warnecke *et al.* 2007, Turnbaugh *et al.* 2007, Xu *et al.* 2007). Der oft diskutierte Nachteil selektiver Primer (es gibt keine wirklich universellen Primer für Prokaryoten) liegt bei diesen Methoden wie auch bei den tRFLP-Verfahren vor, da beide Ansätze auf der PCR-Technologie basieren. Diese Ansätze und insbesondere die Sequenzierung der vielen Klone sind jedoch erheblich teurer als eine Fragmentanalyse. Die Vorteile der tRFLP-Methode liegen damit klar im geringeren Arbeitsaufwand und in der preiswerteren Fragmentanalyse begründet (Rösch *et al.* 2006, Schutte *et al.* 2008).

### 4.3.4 Ethin-Reduktions-Test

Versuchshintergrund zur Ethin-Reduktion als Nachweis für die Gegenwart aktiver Nitrogenase in Umweltproben (Hardy *et al.* 1968): Der Nitrogenase-Komplex (Dinitrogenase und Dinitrogenase-Reduktase) ist in der Lage molekularen, atmosphärischen Stickstoff in mehreren Schritten zu zwei Ammoniak-Molekülen zu reduzieren, die als Ammonium-Ionen durch Aminotransferasen auf  $\alpha$ -Ketoglutarat oder Aspartat übertragen werden und so zu den Aminosäuren Glutamat und Glutamin sowie Asparagin führen. Diese Reaktion ist sehr energieaufwändig und benötigt Reduktionsäquivalente ( $8\text{ e}^-$  über Ferredoxin bereitgestellt) sowie 16 ATP (Fritsche 1999). Die Nitrogenase reduziert jedoch auch andere Dreifachbindungen, zum Beispiel die von Ethin (Acetylen) oder Cyanid (Hardy *et al.* 1968). Daher wird die Reduktion von Ethin zu Ethen genutzt um Nitrogenase-Aktivität experimentell nachzuweisen (Hardy *et al.* 1973). Nach dem ersten Reduktionsschritt zu Ethen entweicht dieses Gas ohne eine weitere Interaktion am Nitrogenase-Komplex und kann daher als Indikator für aktive Nitrogenase dienen.

Ethin kann zu Ethen und schließlich zu Ethan hydriert werden:



Mit vielen Katalysatoren lässt sich diese Hydrierung nicht auf der Alkenstufe (also bei Ethen) stoppen. Unter besonderen Reaktionsbedingungen soll jedoch mit einigen Palladium- oder Nickelkatalysatoren die Ethensynthese aus Ethin möglich sein (Reppe, Walter, *Chemie und Technik der Acetylen-Druck-Reaktionen*, Verlag Chemie 1952). Eine spontane, nicht auf Nitrogenase-Aktivität zurückzuführende Reduktion von Ethin zu Ethen ist unter den angegebenen Versuchsbedingungen demnach auszuschließen. Ethin hat auf der Erde kein

natürliches Vorkommen. Dagegen ist Ethen ein weit verbreitetes Phytohormon (Pflanzenhormon) (Lurssen 1981, Burg und Burg 1965). Um Messfehler zu vermeiden, wurden keinerlei Pflanzenteile bei der Messung eingesetzt.

Die Freisetzung von Ethen aus Arbeiterinnen und Larven *P. gracilis* und *P. salvini* deutete tatsächlich auf Nitrogenaseaktivität hin (Tabelle 3.8 und Abbildung 3.26). Auch in einigen Arbeiterinnen der noch nicht näher bestimmten, mutmaßlich generalistisch lebenden *Pseudomyrmex* sp. PSW06 konnte Ethenfreisetzung nachgewiesen werden. Trotz wiederholter Versuche konnte dagegen keine Ethenproduktion bei den obligaten Pflanzenameisen *P. ferrugineus* und *P. peperi* nachgewiesen werden, was jedoch keine abschließende Beurteilung dieser Arten bezüglich der Nitrogenaseaktivität erlaubt, da nur wenige Ameisen zur Verfügung standen und diese durch die langen Transporte innerhalb Mexikos und nach Deutschland verbunden mit starken Temperaturschwankungen geschädigt sein konnten. Dass auch in vielen Messungen mit *P. gracilis* und *P. salvini* keine Ethenreduktion nachgewiesen werden konnte lag vermutlich am Ernährungszustand der Ameisen und Larven: Ethen konnte, nur dann nachgewiesen werden, wenn etwa eine Stunde vor Beginn der Experimente die Ameisen mit frischer Zuckerlösung (Saccharose 10 %) versorgt wurden. Diese Beobachtung würde gut in das Modell der Interaktion von Ameisen und Bakteriengemeinschaft passen, da N-fixierende Bakterien einen hohen Energiebedarf für die Fixierungsreaktion aufweisen.

### 4.3.5 Isotopenexperiment: $^{15}\text{N}_2$

Die Untersuchung der Anteilsverhältnisse des stabilen Stickstoffisotops  $^{15}\text{N}$  zum häufigeren Isotop  $^{14}\text{N}$  ( $^{15}\text{N}$  macht etwa 0,3663 % des in der Atmosphäre vorhandenen Stickstoffs aus) ermöglicht Einblicke in schwer beobachtbare trophische Beziehungen eines ökologischen Systems (Burris und Wilson 1957). Das natürliche N-Isotopenverhältnis in einer tierischen Probe kann Informationen über die Ernährungsgewohnheiten des Tieres geben, da das schwerere Isotop aufgrund kinetischer Fraktionierung bei der enzymatischen Transamination von einer trophischen Ebene zur nächsten um etwa 3‰ angereichert wird (Post 2002, Macko *et al.* 1986). Ein Vergleich des Isotopenverhältnisses von vermutlicher Nahrungsquelle zum Verhältnis der Isotopen des Herbivor zeigen somit, ob sich ein vermuteter Herbivor tatsächlich monophag verhält oder auch noch andere Nahrungsquellen nutzt (Clement *et al.* 2008, Post 2002). Vergleiche der Isotopenverhältnisse zwischen Ameisenpflanzen und Ameisen konnten zeigen, dass obligat mutualistische Ameisen die Futterquellen der Ameisenpflanzen als alleinige Nahrungsquellen nutzen (Clement *et al.*

2008, Fischer *et al.* 2002, Vasconcelos und Davidson 2000, Sagers *et al.* 2000). Auch ermöglichten derartige Analysen den Nachweis, dass *P. gracilis* neben EFN und Futterkörperchen auch andere Nahrungsquellen nutzt (Clement *et al.* 2008).

Als weitere Möglichkeit lässt sich das Stickstoffisotop  $^{15}\text{N}$  als Marker nutzen, um Stoffwechsel-, Synthese- und Abbauwege in Organismen zu verfolgen. In der vorliegenden Studie wurde  $^{15}\text{N}_2$  als Werkzeug eingesetzt, um eine mögliche Fixierung atmosphärischen Stickstoffs durch mit den Ameisen assoziierte Bakterien nachzuweisen, wie dies für Pflanzen und Termiten bereits verschiedentlich unternommen wurde (Ohkuma *et al.* 1999b, Tayasu 1998, Alexander und Zuberer 1989). Dazu wurden die Ameisen unter einer 10 %igen  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre gehalten, um eine etwaige Fixierung des atmosphärischen Stickstoffs durch einen erhöhten Anteil des schwereren Isotops in den Ameisen nachzuweisen.

Weder Arbeiterinnen noch Larven von *P. ferrugineus* noch von *P. gracilis* zeigten nach einer knappen Woche Inkubation unter einer 10 %igen  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre einen erhöhten Anteil  $^{15}\text{N}$  am Gesamtstickstoff. Allerdings war die Vitalität der durch den Transport geschwächten Tiere eingeschränkt und die Versuchsdauer sehr kurz bemessen, weshalb der Versuch an einer vitalen, sich schon seit einem halben Jahr im Labor befindlichen Kolonie der generalistischen Art *P. salvini* über einen Zeitraum von vier Wochen wiederholt wurde. Während des Versuchs wurden die Ameisen nur mit einer Zuckerlösung als alleinige Nahrungsquelle versorgt. Die Isotopenverhältnisanalyse erbrachte keinen Unterschied zwischen dem Teil der Kolonie, der unter  $^{15}\text{N}_2$ -Atmosphäre gehalten wurde und dem nicht behandelten Kolonieteil. Arbeiterinnen, Puppen und Larven (ganze getrocknete Ameisenlarven, Gaster oder Thorax der Arbeiterinnen mit Darminhalt und somit mit Bakterienflora) beider Ansätze wiesen ein  $\delta^{15}\text{N}$  von etwa 7 ‰ auf. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Kolonie unter den in Anhang 7 (Eilmus 2008) aufgeführten Haltungsbedingungen keinen Stickstoff fixierte. Da jedoch nur eine einzelne Kolonie untersucht werden konnte und diese Kolonie unter künstlichen Bedingungen gehalten worden war, bleibt eine abschließende klare Bewertung der Resultate problematisch.

Neben den Proben (Arbeiterinnen, Larven und Puppen) der Laborkolonie wurden jedoch auch konservierte Freilandproben von *P. salvini* analysiert. Diese Proben zeigten einen  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert von um 2 ‰ im Gegensatz zu 7 ‰ bei der Laborkolonie. Der durchschnittliche Gesamtstickstoffgehalt war dagegen bei Proben aus Freiland und Laborkolonie mit 9,4 %

konstant. Ein  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert dieser Größenordnung (um 2 ‰) spricht für eine überwiegend rein pflanzliche Ernährung dieser Ameisen unter natürlichen Bedingungen (Davidson 1997, Fischer *et al.* 2002, Clement *et al.* 2008, Davidson *et al.* 2003). Der demgegenüber deutlich erhöhte durchschnittliche  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der Laborkolonie weist damit auf eine nicht der natürlichen Ernährung entsprechenden Versorgung dieser Kolonie hin. Die Kolonie wurde permanent mit 10 %iger Saccharoselösung ernährt und erhielt zusätzlich einmal pro Woche Futter tierischer Herkunft in Form von klein geschnittenen Mehlkäferlarven *Tenebrio molitor* und Stabschrecken *Medauroidea extradentata* (Standard-Futtermittel). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese Ernährung eine mögliche N-Fixierung inhibierte.

Der  $\delta^{15}\text{N}$ -Wert der obligaten Akazienameise *P. ferrugineus* lag mit durchschnittlich 0,62 ‰ signifikant (p-Wert = 0,000; Statistica 6, StatSoft; Mann-Whitney U Test) unterhalb der durchschnittlichen  $\delta^{15}\text{N}$ -Werte des Generalisten *P. salvini* (2,3 ‰) und des fakultativen Akazienparasiten *P. gracilis* (1,64 ‰). Wie bereits durch Clement *et al.* 2008 gezeigt, deutet dieser Unterschied des  $\delta^{15}\text{N}$ -Wertes auf die enge Bindung an die Wirtspflanze, wogegen die Daten der Generalisten (*P. salvini*) und fakultativen Parasiten (*P. gracilis*) für weitere Nahrungsquellen sprechen. Allerdings haben auch die Werte für *P. salvini* und *P. gracilis* eine Größenordnung, die für eine überwiegend pflanzliche oder indirekt pflanzliche Kost wie Honigtau spricht.

Die negativen Befunde für N-Fixierung mittels  $^{15}\text{N}_2$ -Methode widersprechen den Ergebnissen der Ethin-Reduktion aus dem vorangegangenen Abschnitt. Allerdings konnte, wie oben besprochen, nur eine Kolonie von *P. salvini* eingehend untersucht werden. Es ist durchaus bekannt, dass sich die Resultate der beiden verschiedenen methodischen Ansätze zum Nachweis der Fixierung von Stickstoff widersprechen können (Ankomah 1995, McNeill *et al.* 1994, Smith und Hume 1987, Hansen *et al.* 1987, Wivstad *et al.* 1987, Martensson und Ljunggren 1984). Zudem entsprachen die Versuchsbedingungen scheinbar nicht den natürlichen Ernährungsgewohnheiten der Tiere. Der Nachweis der N-Fixierung in einem komplexen System bleibt nach wie vor insbesondere bei geringen Fixierungsraten schwer greifbar. Weitere Versuche insbesondere mit *P. ferrugineus*, *P. gracilis* aber auch weiteren arborealen und bekanntermaßen auf pflanzliche Kost, EFN oder Honigtau spezialisierten Ameisenarten mit der  $^{15}\text{N}_2$ -Methode erscheinen mir als unbedingt sinnvoll, um endgültig N-Fixierungskapazitäten von Ameisen und deren assoziierte Mikroorganismen aufdecken oder widerlegen zu können.



## 5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Um einen möglichst umfassenden Überblick über die mit *Pseudomyrmex* assoziierten Bakterien zu gewinnen, wurde eine Variante der tRFLP-Methode (Terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) unter Nutzung des Computerprogramms TReFID (Terminal Restriction Fragment Identifying Program) eingesetzt (Rösch und Bothe 2005, Rösch *et al.* 2006). Diese Methode erlaubte eine qualitative Analyse der Diversität der Bakteriengemeinschaft. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mit den Ameisen assoziierte Bakteriengemeinschaft sich als sehr viel diverser erwies, als bisherige Untersuchungen an anderen verwandten Ameisengattungen dies hätte vermuten lassen (Stoll *et al.* 2007, Van Borm *et al.* 2002b). Die bakteriellen Gemeinschaften unterschieden sich zwischen den untersuchten Arten qualitativ kaum, lediglich die Diversität (ausgehend von den tRF-Daten) schien bei der obligaten Akazienameise *P. ferrugineus* deutlich höher zu sein. Dabei dominierten die Gruppen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Sphingobacteria, Bacilli, Clostridia, Flavobacteria und Bacteroidetes, die 90 % der Diversität der tRF-Muster darstellten. Damit ähnelte die bakterielle Gemeinschaft sehr jener der Termiten (König *et al.* 1999). Da es sich bei der Biozönose des Termitendarms um eine Anpassung an defizitäre, einseitige Kost (Cellulose) handelt, konnte vermutet werden, dass eine derartige Funktion auch bei den Ameisen vorlag. Es konnten viele Mikroorganismen nachgewiesen werden, die auf fermentative Prozesse, N-Recycling und N-Fixierung im Darm der Ameisen schließen lassen. In der Tat deuteten die Beobachtung einer aktiven Ethin-Reduktion auf aktive Nitrogenase bei *P. gracilis* und *P. salvini* hin. Die Aufnahme von Stickstoff konnte jedoch bislang mittels  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopenanalyse nicht bestätigt werden. Dafür sprechen Daten der  $^{15}\text{N}_2$ -Isotopenanalyse der Freilandproben von *P. salvini* für eine rein pflanzliche Ernährungsweise.

Die anzestrale Lebensweise der Gattung *Pseudomyrmex* scheint generalistisch gewesen zu sein (Ward 1993, Kautz *et al.* in press.). Als Generalisten ernähren sich diese Ameisen bevorzugt von zuckrigen Lösungen (EFN, Honigtau) und „sammeln“ zusätzlich tierisches Eiweiß z. B. in Form toter Insekten (Ward 1993, Clement *et al.* 2008, Eilmus 2008). Diese Lebensweise konnte vielen Baum bewohnenden tropischen Ameisen nachgewiesen werden (Davidson und Patrell-Kim 1996, Davidson *et al.* 2003, Woodring *et al.* 2004, Way 1962, Rico-Gray 1993, Pointin 1978, Pfeiffer und Linsenmair 2000, Oliveira und Freitas 2004, Del-Claro und Oliveira 1999, Del-Claro und Oliveira 1993, Cook und Davidson 2006, Blüthgen *et*

al. 2000, Blüthgen *et al.* 2004b, Blüthgen *et al.* 2004a, Almeida-Neto *et al.* 2003). Zu diesen Generalisten werden *P. salvini* und auch *P. gracilis* gezählt, wobei *P. gracilis* auch als Parasit der Ameisenakazien auftreten kann (Clement *et al.* 2008, Clement 2005). Die an limitierte Nahrungsverhältnisse des Lebensraums angepasste Darmflora erlaubte es vermutlich gleichsam präadaptiv den Vorläufern von *P. ferrugineus* von der „Generalisten-Kost“ auf die Akaziendiät zu wechseln. Dies erklärt das Phänomen, dass innerhalb der Pseudomyrmecinae sich z. T. hoch spezialisierte Pflanzenameisen mit rein pflanzlicher Kost (Clement *et al.* 2008, Heil *et al.* 2005b) mindestens zehnmal – allein sechsmal in der Gattung *Pseudomyrmex* – und scheinbar völlig unabhängig voneinander entwickelten (Ward 1993, Ward und Downie 2005). An diesen Spezialisierungs- und dadurch bedingten Speziationsprozessen könnte die mutualistische Darmflora der Ameisen einen großen Anteil gehabt haben, denn Mutualismen zwischen phytophagen Insekten und Mikroorganismen wurden jüngst als Triebfeder einer adaptiven Diversifikation beschrieben (Janson *et al.* 2008). Dies scheint seine Bestätigung nicht nur bei den artenreichen Pflanzensaugern, sondern auch bei der mit ca. 1.000 beschriebenen Spezies artenreichsten Ameisengattung *Camponotus* (Hölldobler und Wilson 1990) und deren Symbionten *Blochmannia* zu finden. Was bedeuten diese Möglichkeiten im Rückschluss für die Natur des Mutualismus zwischen Ameisenakazie und Pflanzenameise? Würde in Akazienameisen N-Fixierung stattfinden, würde das für ein Modell des Mutualismus sprechen, in dem die Partner ihre Investitionen in den jeweils anderen Partner so gering wie möglich halten. Die Futterkörperchen der Akazien stellen die primäre Proteinquelle der mutualistischen Ameisen dar, enthalten jedoch nur wenige essentielle Aminosäuren. Durch eine N-fixierende und/oder N-recyclende Darmflora gleichen die Ameisen das Defizit aus und die Ameisenpflanze bleibt den mutualistischen Ameisen als Nische somit erhalten. Auf das *Prisoner's Dilemma* bezogen würde dies bedeuten, dass Kooperation stattfindet, sich diese aber auf das Nötigste beschränkt (Doebeli und Knowlton 1998, Gibbons und Dugatkin 1997, Brems 1996).

Weitere Versuche insbesondere mit *P. ferrugineus*, *P. gracilis* aber auch weiteren arborealen und auf pflanzliche Kost, EFN oder Honigtau spezialisierten Ameisenarten mit der <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-Methode erscheinen mir als unbedingt sinnvoll, um endgültig N-Fixierungskapazitäten von Ameisen und deren assoziierte Mikroorganismen aufdecken oder widerlegen zu können. Weitere Feldstudien an den vielen bislang nur wenig untersuchten arborealen Ameisen könnten Erklärungsansätze für das Paradoxon des enormen Anteils der Ameisen an der tierischen Biomasse tropischer Waldlebensräume bieten.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACINAS, S. G., RODRIGUEZVALERA, F. & PEDROSALIO, C. (1997) Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. *Fems Microbiology Ecology*, **24**, 27-40.
- ADAMS, D. G. & DUGGAN, P. S. (2008) Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *Journal Of Experimental Botany*, **59**, 1047-1058.
- ADAMS, L. & BOOPATHY, R. (2005) Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology*, **96**, 1592-1598.
- ALEXANDER, D. B. & ZUBERER, D. A. (1989) (N-15)-N-2 fixation by bacteria associated with maize roots at a low partial O-2 pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1748-1753.
- ALLEN, M. M. & STANIER, R. Y. (1968) Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 199-202.
- ALMEIDA-NETO, M., IZZO, T. J., RAIMUNDO, R. L. G. & ROSSA-FERES, D. C. (2003) Reciprocal interference between ants and stingless bees attending the honeydew-producing homopteran *Aetalion reticulatum* (Homoptera: Aetalionidae). *Sociobiology*, **42**, 369-380.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143-169.
- ANKOMAH, A. B. (1995) Comparison of methods of estimating biological nitrogen-fixation using cowpea cultivars from Ghana. *Tropical Agriculture*, **72**, 34-38.
- ARONSON, J., OVALLE, C. & AVENDANO, J. (1992) Early growth rate and nitrogen fixation potential in forty - four legume species grown in an acid and a neutral soil from central Chile. *Forest Ecology and Management*, **47**, 225 - 244.
- ASH, S. (1996) Evidence of arthropod-plant interactions in the Upper Triassic of the southwestern United States. *Lethaia*, **29**, 237-248.
- ATTWOOD, M. M. & HARDER, W. (1972) Rapid and specific enrichment procedure for *Hyphomicrobium* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **38**, 369-&.
- AYRE, G. L. (1963) Feeding behaviour and digestion in *Camponotus herculeanus* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **6**, 165-170.
- BAKALIDOU, A., KAMPFER, P., BERCHTOLD, M., KUHNIGK, T., WENZEL, M. & KÖNIG, H. (2002) *Cellulosimicrobium variabile* sp nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **52**, 1185-1192. (DOI 10.1099/ijls.0.01904-0.)
- BAKKEN, L. R. & OLSEN, R. A. (1987) The relationship between cell-size and viability of soil bacteria. *Microb. Ecol.*, **13**, 103-114.
- BALACHANDAR, D., SANDHIYA, G. S., SUGITHA, T. C. K. & KUMAR, K. (2006) Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp in rice. *World J Microbiol Biotechnol*, **22**, 707-712.
- BAST, E. (1999) Mikrobiologische Methoden. *Spektrum, Akad. Verl.*
- BEATTIE, A. J. (1985) *The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms*, Cambridge, England, Cambridge University Press.
- BEHAR, A., YUVAL, B. & JURKEVITCH, E. (2005) Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol. Ecol.*, **14**, 2637-2643. (DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02615.x.)
- BELT, T. (1874) *The naturalist in Nicaragua*, London, J.M. Dent and Sons.
- BENEMANN, J. R. (1973) Nitrogen-fixation in termites. *Science*, **181**, 164-165.
- BENHAMOU, N., GAGNÉ, S., LE QUÉRÉ, D. & DEHBI, L. (2000) Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: Beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia*

- plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, **90**, 45-56.
- BENSON, M. J., GAWRINSKI, J. D., EVELEIGH, D. E. & BENSON, D. R. (2004) Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 616-620. (DOI 10.1128/AEM.70.1.616-620.2004.)
- BENTLEY, B. L. (1977) The protective function of ants visiting the extrafloral nectaries of *Bixa orellana* (Bixaceae). *Journal of Ecology*, **65**, 27-38.
- BERLANGA, M., PASTER, B. J. & GUERRERO, R. (2007) Coevolution of symbiotic spirochete diversity in lower termites. *Int Microbiol.*, **10**, 133-139. (DOI 10.2436/20.1501.01.19.)
- BLOCHMANN, F. (1892) Über das Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Zentbl. Bakteriol.*, **11**, 234-240.
- BLÜTHGEN, N. & FIEDLER, K. (2004) Competition for composition: Lessons from nectar-feeding ant communities. *Ecology*, **85**, 1479-1485.
- BLÜTHGEN, N., GOTTSBERGER, G. & FIEDLER, K. (2004a) Sugar and amino acid composition of ant-attended nectar and honeydew sources from an Australian rainforest. *Austral Ecology*, **29**, 418-429.
- BLÜTHGEN, N., STORK, N. E. & FIEDLER, K. (2004b) Bottom-up control and co-occurrence in complex communities: honeydew and nectar determine a rainforest ant mosaic. *Oikos*, **106**, 344-358.
- BLÜTHGEN, N., VERHAAGH, M., GOITÍA, W., JAFFÉ, K., MORAWETZ, W. & BARTHLOTT, W. (2000) How plants shape the ant community in the Amazonian rainforest canopy: the key role of extrafloral nectaries and homopteran honeydew. *Oecologia*, **125**, 229-240.
- BOURSAUX-EUDE, C. & GROSS, R. (2000) New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Research In Microbiology*, **151**, 513-519.
- BRAEKMAN, J. C. & DALOZE, D. (1996) Defensive alkaloids from ants. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, **7**, 251-256.
- BREMBS, B. (1996) Chaos, cheating and cooperation: Potential solutions to the Prisoner's Dilemma. *Oikos*, **76**, 14-24.
- BREZNAK, J. A. (2002) Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. *Integrative And Comparative Biology*, **42**, 313-318.
- BREZNAK, J. A. & BLUM, J. S. (1991) Mixotrophy in the termite gut acetogen *Sporomusa termitida*. *Archives Of Microbiology*, **156**, 105-110.
- BREZNAK, J. A., BRILL, W. J., MERTINS, J. W. & COPPEL, H. C. (1973) Nitrogen-fixation in termites. *Nature*, **244**, 577-579.
- BRONSTEIN, J. L. (1994) Our current understanding of mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, **69**, 31-51.
- BRONSTEIN, J. L. (2001) The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters*, **4**, 277-287.
- BROWN, J. R., DOUADY, C. J., ITALIA, M. J., MARSHALL, W. E. & STANHOPE, M. J. (2001) Universal trees based on large combined protein sequence data sets. *Nature Genetics*, **28**, 281-285.
- BROWN, W. L. J. (1960) Ants, acacias, and browsing mammals. *Ecology*, **41**, 587-592.
- BRUNE, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends In Biotechnology*, **16**, 16-21.
- BUCHNER, P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*, New York, J. Wiley & Sons.
- BURG, S. P. & BURG, E. A. (1965) Ethylene action and ripening of fruits - Ethylene influences growth and development of plants and is hormone which initiates fruit ripening. *Science*, **148**, 1190 - 1196

- BURRIS, R. H. & WILSON, P. W. (1957) Methods for measurement of nitrogen fixation. p. 355-366. In S. P. Colowick and N. O. Kaplan [ed.], *Methods of enzymology*, vol. 4. Academic Press, Inc., New York.
- BYRNE, D. N. & MILLER, W. B. (1990) Carbohydrate and amino-acid-composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal Of Insect Physiology*, **36**, 433-439.
- CAFARO, M. J. & CURRIE, C. R. (2005) Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. *Canadian Journal Of Microbiology*, **51**, 441-446.
- CAI, Y. M., BENNO, Y., OGAWA, M., OHMOMO, S., KUMAI, S. & NAKASE, T. (1998) Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Applied And Environmental Microbiology*, **64**, 2982-2987.
- CAPONE, D. G. (2001) Marine nitrogen fixation: what's the fuss? *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**, 341-348.
- CARTER, C., HEALY, R., O'TOOL, N. M., NAQVI, S. M. S., REN, G., PARK, S., BEATTIE, G. A., HORNER, H. T. & THORNBURG, R. W. (2007) Tobacco nectaries express a novel NADPH oxidase implicated in the defense of floral reproductive tissues against microorganisms. *Plant Physiology*, **143**, 389-399.
- CASIDA, L. E. (1982) *Ensifer adhaerens* gen-nov, sp-nov - A bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**, 339-345.
- CASTRO, M. D. & DEMARCO, D. (2008) Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Natural Product Communications*, **3**, 1273-1284.
- CHAE, K. J., RAMESHWAR, T., JANG, A., KIM, S. H. & KIM, I. S. (2008) Analysis of the nitrifying bacterial community in BioCube sponge media using fluorescent in situ hybridization (FISH) and microelectrodes. *Journal Of Environmental Management*, **88**, 1426-1435.
- CHANDLER, S. M., WILKINSON, T. L. & DOUGLAS, A. E. (2008) Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. B*, **275**, 565-570. (DOI 10.1098/rspb.2007.1478.)
- CHO, J. C. & GIOVANNONIO, S. J. (2003) *Fulvimarina pelagi* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium that forms a deep evolutionary lineage of descent in the order 'Rhizobiales'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1853-1859. (DOI 10.1099/ij.0.02644-0.)
- CHUNG, S. Y., MAEDA, M., SONG, E., HORIKOSHI, K. & KUDO, T. (1994) A Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium, *Rhodococcus-Erythropolis* Strain Ta421, Isolated From A Termite Ecosystem. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, **58**, 2111-2113.
- CLEMENT, L. W. 2005 *Pseudomyrmex gracilis* - Ein Parasit auf Ameisenkakazien? *Dept. of Ecology*. Jena, Friedrich-Schiller-Universität.
- CLEMENT, L. W., KÖPPEN, S. C. W., BRAND, W. A. & HEIL, M. (2008) Strategies of a parasite of the ant-acacia mutualism. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **62**, 953-962. (DOI 10.1007/s00265-007-0520-1.)
- CONNOR, R. C. (1995) The benefits of mutualism - a conceptual-framework. *Biol. Rev. Biol. Proc. Camb. Phil. Soc.*, **70**, 427-457.
- COOK, S. C. & DAVIDSON, D. W. (2006) Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **118**, 1-10.
- CURRIE, C. R. (2001a) A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 357-380.
- CURRIE, C. R. (2001b) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*, **128**, 99-106.

- CURRIE, C. R., BOT, A. N. M. & BOOMSMA, J. J. (2003) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, **101**, 91-102.
- CURRIE, C. R., POULSEN, M., MENDENHALL, J., BOOMSMA, J. J. & BILLEN, J. (2006a) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, **311**, 81-83. (DOI 10.1126/science.1119744.)
- CURRIE, C. R., POULSEN, M., MENDENHALL, J., BOOMSMA, J. J. & BILLENS, J. (2006b) Mutualistic bacteria in fungus-growing ants. Coevolved Crypts and Exocrine Glands Support. *Science*, **311**.
- CURRIE, C. R., SCOTT, J. A., SUMMERBELL, R. C. & MALLOCH, D. (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, **398**, 701-704.
- CURTIS, T. P., SLOAN, W. T. & SCANNELL, J. W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 10494-10499.
- DAVIDSON, D. W. (1997) The role of resource imbalances in the evolutionary ecology of tropical arboreal ants. *Biological Journal of the Linnean Society*, **61**, 153-181.
- DAVIDSON, D. W., CASTRO-DELGADO, S. R., ARIAS, J. A. & MANN, J. (2006) Unveiling a ghost of Amazonian rain forests: *Camponotus mirabilis*, engineer of Guadua bamboo. *Biotropica*, **38**, 653-660.
- DAVIDSON, D. W., COOK, S. C., SNELLING, R. R. & CHUA, T. H. (2003) Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science*, **300**, 969-972.
- DAVIDSON, D. W. & PATRELL-KIM, L. (1996) Tropical arboreal ants: why so abundant? IN Gibson, A. C. (Ed.) *Neotropical Biodiversity and Conservation*. Los Angeles, Mildred E. Mathias Botanical Garden, University of California.
- DE BARY, A. (1879) Die Erscheinung der Symbiose. Karl J. Trüber, Strassburg. 30 pp.
- DE VRIES, E. J., JACOBS, G., SABELIS, M. W., MENKEN, S. B. J. & BREEUWER, J. A. J. (2004) Diet-dependent effects of gut bacteria on their insect host: the symbiosis of *Erwinia* sp and western flower thrips. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **271**, 2171-2178. (DOI 10.1098/rspb.2004.2817.)
- DE VRIES, E. J., VAN DER WURFF, A. W. G., JACOBS, G. & BREEUWER, J. A. J. (2008) Onion thrips, *Thrips tabaci*, have gut bacteria that are closely related to the symbionts of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal Of Insect Science*, **8**.
- DEL-CLARO, K. & OLIVEIRA, P. S. (1993) Ant-homoptera interaction - Do alternative sugar sources distract tending ants. *Oikos*, **68**, 202-206.
- DEL-CLARO, K. & OLIVEIRA, P. S. (1999) Ant-homoptera interactions in a neotropical savanna: The honeydew-producing treehopper, *Guayaquila xiphias* (Membracidae), and its associated ant fauna on *Didymopanax vinosum* (Araliaceae). *Biotropica*, **31**, 135-144.
- DETTNER, K. & PETERS, W. (1999) Lehrbuch der Entomologie. 98-110.
- DEVIJVER, C., MACOURS, P., BRAEKMAN, J. C., DALOZE, D. & PASTEELS, J. M. (1995) Short syntheses of (+/-)-tetraponerine-5 and (+/-)-tetraponerine-6 - The structures of tetraponerine-1 and tetraponerine-2, and a revision of the structures of (+)-tetraponerine-5 and (+)-tetraponerine-6. *Tetrahedron*, **51**, 10913-10922.
- DICKE, M., VAN BEEK, T. A., POSTHUMUS, M. A., BEN DOM, N., VAN BOKHOVEN, H. & DE GROOT, A. E. (1990) Isolation and identification of volatile kairomone that affects *Acarine* predator-prey interactions. Involvement of the host plant int its production. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 381-395.
- DOEBELI, M. & KNOWLTON, N. (1998) The evolution of interspecific mutualisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8676-8680.
- DOUGLAS, A. E. (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Ann. Rev. Entomol.*, **43**, 17-38.

- DOUGLAS, A. E. (2006) Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.*, **57**, 747-754. (DOI 10.1093/jxb/erj067.)
- DREYFUS, B., GARCIA, J. L. & GILLS, M. (1988) Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **38**, 89-98.
- DROGE, S., FROHLICH, J., RADEK, R. & KÖNIG, H. (2006) *Spirochaeta coccoides* sp nov., a novel coccoid spirochete from the hindgut of the termite *Neotermes castaneus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 392-397. (DOI 10.1128/AEM.72.1.392-397.2006.)
- DROGE, S., LIMPER, U., EMTIAZI, F., SCHONIG, I., PAVLUS, N., DRZYZGA, O., FISCHER, U. & KÖNIG, H. (2005) In vitro and in vivo sulfate reduction in the gut contents of the termite *Mastotermes darwiniensis* and the rose-chaffer *Pachnoda marginata*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**, 57-64.
- DROGE, S., RACHEL, R., RADEK, R. & KÖNIG, H. (2008) *Treponema isopterocolens* sp nov., a novel spirochaete from the hindgut of the termite *Incisitermes tabogae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 1079-1083. (DOI 10.1099/ijs.0.64699-0.)
- DUMLER, J. S., CHOI, K. S., GARCIA-GARCIA, J. C., BARAT, N. S., SCORPIO, D. G., GARYU, J. W., GRAB, D. J. & BAKKEN, J. S. (2005) Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 1828-1834.
- DUTTA, D. & GACHHUI, R. (2006) Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **56**, 1899-1903.
- DUTTA, D. & GACHHUI, R. (2007) Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp nov., isolated from Kombucha tea. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **57**, 353-357.
- DYKHUIZEN, D. E. (1998) Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology*, **73**, 25-33.
- ECKBURG, P. B. & RELMAN, D. A. (2007) The role of microbes in Crohn's disease. *Clinical Infectious Diseases*, **44**, 256-262.
- EILMUS, S. (2008) *Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) – Notes on biology and keeping in captivity (Pseudomyrmecinae). *Arthropoda*, **16(3)**, 34-37.
- EILMUS, S., ROSCH, C. & BOTHE, H. (2007) Prokaryotic life in a potash-polluted marsh with emphasis on N-metabolizing microorganisms. *Environ. Pollut.*, **146**, 478-491. (DOI 10.1016/j.envpol.2006.07.008.)
- EMTIAZI, G., ETEMADIFAR, Z. & TAVASSOLI, M. (2003) A novel nitrogen-fixing cellulytic bacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein. *Biomass & Bioenergy*, **25**, 423-426.
- FELDHAAAR, H., STRAKA, J., KRISCHKE, M., BERTHOLD, K., STOLL, S., MUELLER, M. J. & GROSS, R. (2007) Nutritional upgrading for omnivorous carpenter ants by the endosymbiont *Blochmannia*. *BMC Biol.*, **5:48**, 1-11. (DOI 10.1186/1741-7007-5-48.)
- FISCHER, K., HAHN, D., AMANN, R. I., DANIEL, O. & ZEYER, J. (1995) In-situ analysis of the bacterial community in the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L by whole-cell hybridization. *Canadian Journal Of Microbiology*, **41**, 666-673.
- FISCHER, R. C., RICHTER, A., WANEK, W. & MAYER, V. (2002) Plants feed ants: food bodies of myrmecophytic *Piper* and their significance for the interaction with *Pheidole bicornis* ants. *Oecologia*, **133**, 186-192.
- FLETCHER, J., WAYADANDE, A., MELCHER, U. & YE, F. C. (1998) The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: A closer look. *Phytopathology*, **88**, 1351-1358.
- FORTERRE, P. (1995) Looking for the most primitive organism(s) on earth today - The state-of-the-art. *Planetary And Space Science*, **43**, 167-177.
- FORTERRE, P. & PHILIPPE, H. (1999) Where is the root or the universal tree of life? *Bioessays*, **21**, 871-879.

- FOWLER, H. G., BUENO, O. C., SADATSUNE, T. & MONTELLI, A. C. (1993) Ants as potential vectors of pathogens in hospitals in the state of Sao-Paulo, Brazil. *Insect Sci. Applic.*, **14**, 367-370.
- FRANK, D. N., AMAND, A. L. S., FELDMAN, R. A., BOEDEKER, E. C., HARPAZ, N. & PACE, N. R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 13780-13785.
- FRENCH, J. R. J., TURNER, G. L. & BRADBURY, J. F. (1976) Nitrogen-fixation by bacteria from hindgut of termites. *J. Gen. Microbiol.*, **95**, 202-206.
- FRIEDRICH, U., NAISMITH, M. M., ALTENDORF, K. & LIPSKI, A. (1999) Community analysis of biofilters using fluorescence in situ hybridization including a new probe for the *Xanthomonas* branch of the class Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3547-3554.
- FRITSCH, W. (1999) Mikrobiologie. 270-280.
- FROHLICH, J., KOUSTIANE, C., KAMPFER, P., ROSSELLO-MORA, R., VALENS, M., BERCHTOLD, M., KUHNIGK, T., HERTEL, H., MAHESHWARI, D. K. & KÖNIG, H. (2007) Occurrence of rhizobia in the gut of the higher termite *Nasutitermes nigriceps*. *Syst Appl Microbiol.*, **30**, 68-74.
- FROHLICH, J., SASS, H., BABENZIEN, H. D., KUHNIGK, T., VARMA, A., SAXENA, S., NALEPA, C., PFEIFFER, P. & KÖNIG, H. (1999) Isolation of *Desulfovibrio intestinalis* sp nov from the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis*. *Can. J. Microbiol.*, **45**, 145-152.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E., BUSTILLOS-CRISTALES, R., TAPIA-HERNANDEZ, A., JIMENEZ-SALGADO, T., WANG, E. T., MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp nov and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp nov, associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **51**, 1305-1314.
- FUKATSU, T., KOGA, R., SMITH, W. A., TANAKA, K., NIKOH, N., SASAKI-FUKATSU, K., YOSHIZAWA, K., DALE, C. & CLAYTON, D. H. (2007) Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies. *Applied And Environmental Microbiology*, **73**, 6660-6668.
- GARRAFFO, H. M., SPANDE, T. F., JAIN, P., KANEKO, T., JONES, T. H., BLUM, M. S., ALI, T. M. M., SNELLING, R. R., ISBELL, L. A., ROBERTSON, H. G. & DALY, J. W. (2001) Ammonia chemical ionization tandem mass spectrometry in structural determination of alkaloids. II. Tetraoponerines from pseudomyrmecine ants. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, **15**, 1409-1415.
- GARRITY, G. (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer.
- GAUDERMANN, P., VOGL, I., ZIENTZ, E., SILVA, F. J., MOYA, A., GROSS, R. & DANDEKAR, T. (2006) Analysis of and function predictions for previously conserved hypothetical or putative proteins in *Blochmannia floridanus*. *Bmc Microbiology*, **6**.
- GIBBONS, M. & DUGATKIN, L. A. (1997) Cooperation and the Prisoner's Dilemma: towards testable models of mutualism versus reciprocity. *Animal Behaviour*, **54**, 551-557.
- GONZALEZ-TEUBER, M., EILMUS, S., MUCK, A., SVATO, A. & HEIL, M. (in press) Pathogenesis-related proteins protect extrafloral nectar from microbial infestation. *The Plant Journal*.
- GONZALEZ-TEUBER, M. & HEIL, M. (submitted) Role of extrafloral nectar amino acids for the preferences of facultative and obligate ant mutualism. *Journal Of Chemical Ecology*.
- HAINE, E. R. (2008) Symbiont-mediated protection. *Proc. R. Soc. B*, **275**, 353-361. (DOI 10.1098/rspb.2007.1211.)
- HANSEN, A. P., PATE, J. S. & ATKINS, C. A. (1987) Relationships between acetylene-reduction activity, hydrogen evolution and nitrogen-fixation in nodules of *Acacia* spp -



- Experimental background to assaying fixation by acetylene-reduction under field conditions. *Journal Of Experimental Botany*, **38**, 1-12.
- HARDY, R. W. F., BURNS, R. C. & HOLSTEN, R. D. (1973) Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, **5**, 47-81.
- HARDY, R. W. F., HOLSTEN, R. D., JACKSON, E. K. & BURNS, R. C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, **43**, 1185-1207.
- HEIL, M. (2004) Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology*, **92**, 527-536.
- HEIL, M. (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, **178**, 41-61.
- HEIL, M., BAUMANN, B., KRÜGER, R. & LINSENMAIR, K. E. (2004a) Main nutrient compounds in food bodies of Mexican *Acacia* ant-plants. *Chemoecology*, **14**, 45-52.
- HEIL, M., BUCHLER, R. & BOLAND, W. (2005a) Quantification of invertase activity in ants under field conditions. *J. Chem. Ecol.*, **31**, 431-437.
- HEIL, M., FIALA, B., KAISER, W. & LINSENMAIR, K. E. (1998) Chemical contents of *Macaranga* food bodies: adaptations to their role in ant attraction and nutrition. *Functional Ecology*, **12**, 117-122.
- HEIL, M., FIALA, B., MASCHWITZ, U. & LINSENMAIR, K. E. (2001a) On benefits of indirect defence: short- and long-term studies in antiherbivore protection via mutualistic ants. *Oecologia*, **126**, 395-403.
- HEIL, M., GREINER, S., MEIMBERG, H., KRUGER, R., NOYER, J. L., HEUBL, G., LINSENMAIR, K. E. & BOLAND, W. (2004b) Evolutionary change from induced to constitutive expression of an indirect plant resistance. *Nature*, **430**, 205-208.
- HEIL, M., KOCH, T., HILPERT, A., FIALA, B., BOLAND, W. & LINSENMAIR, K. E. (2001b) Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **98**, 1083-1088.
- HEIL, M., KOCH, T., HILPERT, A., FIALA, B., BOLAND, W. & LINSENMAIR, K. E. (2002) Extrafloral nectar produced by *Macaranga tanarius* is an induced, indirect defence against herbivores. IN Baldwin, I., Dicke, M., Haukioja, E., Mauch-Mani, B. & Schmitt, A. (Eds.) *Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases*. IOBC/wprs Bulletin.
- HEIL, M. & MCKEY, D. (2003) Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **34**, 425-453. (DOI 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132410.)
- HEIL, M., RATKE, J. & BOLAND, W. (2005b) Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism. *Science*, **308**, 560-563. (DOI 10.1126/science.1107536.)
- HERLEMANN, D. P. R., GEISSINGER, O. & BRUNE, A. (2007) The termite group I phylum is highly diverse and widespread in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6682-6685.
- HERRE, E. A., KNOWLTON, N., MUELLER, U. G. & REHNER, S. A. (1999) The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends. Ecol. Evol.*, **14**, 49-53.
- HILGENBOECKER, K., HAMMERSTEIN, P., SCHLATTMANN, P., TELSCHOW, A. & WERREN, J. H. (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.*, **281**, 215-220. (DOI 10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x.)
- HINK, W. F., PAPPAS, P. W. & JAWORSKI, D. C. (1994) Partial biochemical characterization of venom from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, **32**, 763-772.

- HOGENHOUT, S. A., OSHIMA, K., AMMAR, E. D., KAKIZAWA, S., KINGDOM, H. N. & NAMBA, S. (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, **9**, 403-423.
- HOGG, R. V. & CRAIG, A. T. (1995) *Mathematical Statistics*, 5th ed., Prentice Hall, pp. 251-2.
- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. (1990) *The ants*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer.
- HONGO, Y., DEEVONG, P., HATTORI, S., INOUE, T., NODA, S., NOPARATNARAPORN, N., KUDO, T. & OHKUMA, M. (2006) Phylogenetic diversity, localization, and cell morphologies of members of the candidate phylum TG3 and a subphylum in the phylum Fibrobacteres, recently discovered bacterial groups dominant in termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6780-6788.
- HONGO, Y., SHARMA, V. K., PRAKASH, T., NODA, S., TAYLOR, T. D., KUDO, T., SAKAKI, Y., TOYODA, A., HATTORI, M. & OHKUMA, M. (2008a) Complete genome of the uncultured Termite Group 1 bacteria in a single host protist cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 5555-5560.
- HONGO, Y., SHARMA, V. K., PRAKASH, T., NODA, S., TOH, H., TAYLOR, T. D., KUDO, T., SAKAKI, Y., TOYODA, A., HATTORI, M. & OHKUMA, M. (2008b) Genome of an endosymbiont coupling N-2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. *Science*, **322**, 1108-1109.
- HORIIE, T., HAMADA, K., KANAYA, S. & SHINOZAWA, T. (2001) Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nature Cell Biology*, **3**, 210-214.
- HOSOKAWA, T., KIKUCHI, Y. & FUKATSU, T. (2007a) How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Molecular Ecology*, **16**, 5316-5325.
- HOSOKAWA, T., KIKUCHI, Y., NIKOH, N., SHIMADA, M. & FUKATSU, T. (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *Plos Biology*, **4**, 1841-1851.
- HOSOKAWA, T., KIKUCHI, Y., SHIMADA, M. & FUKATSU, T. (2007b) Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proc. R. Soc. B*, **274**, 1979-1984. (DOI 10.1098/rspb.2007.0620.)
- HOSOKAWA, T., KIKUCHI, Y., SHIMADA, M. & FUKATSU, T. (2008) Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biology Letters*, **4**, 45-48.
- HOUGENEITZMAN, D. & RAUSHER, M. D. (1994) Interactions between herbivorous insects and plant-insect coevolution. *American Naturalist*, **143**, 677-697.
- HU, S. S., DILCHER, D. L., JARZEN, D. M. & TAYLOR, D. W. (2008) Early steps of angiosperm-pollinator coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 240-245.
- IGLESIAS, M. T., DE LORENZO, C., POLO, M. D., MARTIN-ALVEREZ, P. J. & PUEYO, E. (2004) Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **52**, 84-89.
- IIDA, T., OHKUMA, M., OHTOKO, K. & KUDO, T. (2000) Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. *Fems Microbiology Ecology*, **34**, 17-26.
- IKEDA-OHTSUBO, W., DESAI, M., STINGLT, U. & BRUNE, A. (2007) Phylogenetic diversity of 'Endomicrobia' and their specific affiliation with termite gut flagellates. *Microbiology-Sgm*, **153**, 3458-3465.
- ITAKURA, S., UESHIMA, K., TANAKA, H. & ENOKI, A. (1995) Degradation of wood components by subterranean termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Mokuzai Gakkaishi*, **41**, 580-586.

- JAMES, E. K. & OLIVARES, F. L. (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **17**, 77-119.
- JANG, E. B. & CHAN, H. T. (1993) Alleviation of acetic-acid production during mass rearing of the mediterranean fruit-fly (Diptera, Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, **86**, 301-309.
- JANSON, E. M., STIREMAN, J. O., SINGER, M. S. & ABBOT, P. (2008) Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution*, **62**, 997-1012.
- JANZ, N. & NYLIN, S. (1998) Butterflies and plants: A phylogenetic study. *Evolution*, **52**, 486-502.
- JANZEN, D. H. (1966) Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*, **20**, 249-275.
- JANZEN, D. H. (1967) Interaction of the bull's-horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in eastern Mexico. *Kansas University Science Bulletin*, **47**, 315-558.
- JANZEN, D. H. (1974) *Swollen-thorn acacias of Central America*, Washington DC, USA, Smithsonian Institution Press.
- JANZEN, D. H. (1985) The natural history of mutualisms. In: *The Biology of Mutualism* (ed. Bucher, D.H.), 40-99.
- JARVIS, B. D. W., VAN BERKUM, B., CHEN, W. X., NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., CLEYET-MAREL, J. C. & GILLIS, M. (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 895-898.
- JORDAN, D. C. (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen-nov, a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **32**, 136-139.
- JOSEPH, S. J., HUGENHOLTZ, P., SANGWAN, P., OSBORNE, C. A. & JANSSEN, P. H. (2003) Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7210-7215.
- KACANIOVA, M., CHLEBO, R., KOPERNICKY, M. & TRAKOVICKA, A. (2004) Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiologica*, **49**, 169-171.
- KANE, M. D., BRAUMAN, A. & BREZNAK, J. A. (1991) *Clostridium mayombe* sp-nov, An H-2/Co-2 acetogenic bacterium from the gut of the african soil-feeding termite *Cubitermes speciosus*. *Arch Microbiol.*, **156**, 99-104.
- KATO, K., KOZAKI, S. & SAKURANAGA, M. (1998) Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. *Biotechnology Letters*, **20**, 459-462.
- KAUTZ, S., LUMBSCH, H. T., WARD, P. S. & HEIL, M. (in press.) How to prevent cheating: A digestive specialization ties mutualistic plant-ants to their ant-plant partners.
- KEELER, K. H. (1979) Distribution of plants with extrafloral nectaries and ants at two different elevations in Jamaica. *Biotropica*, **11**, 152-154.
- KEELER, K. H. (1980) Distribution of plants with extrafloral nectaries in temperate communities. *American Midland Naturalist*, **104**, 274-280.
- KEELER, K. H. (2008) World list of plants with extrafloral necaries. <http://www.biosci.unl.edu/Emeriti/keeler/extrafloral/Cover.htm>.
- KENZAKA, T., YAMAGUCHI, N., TANI, K. & NASU, M. (1998) rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology-Sgm*, **144**, 2085-2093.
- KIKUCHI, Y., MENG, X. Y. & FUKATSU, T. (2005) Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4035-4043.
- KNEIP, C., LOCKHART, P., VOSS, C. & MAIER, U. G. (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes - New models for symbiosis. *Bmc Evolutionary Biology*, **7**.

- KOHLER, T., STINGL, U., MEUSER, K. & BRUNE, A. (2008) Novel lineages of planctomycetes densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes spp.*). *Environ. Microbiol.*, **10**, 1260-1270. (DOI 10.1111/j.1462-2920.2007.01540.x.)
- KÖNIG, H. (2006) *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 620-627. (DOI 10.1111/j.1365-2672.2006.02914.x.)
- KÖNIG, H., BERCHTOLD, M., FROHLICH, J., WENZEL, M. & EMTIAZI, F. (1999) The microbiology of the termite gut. *Communications Of The German Society For General And Applied Entomology*, **12**, 219-222.
- KÖNIG, H., FROHLICH, J., LI, L., WENZEL, M., BERCHTOLD, M., DROGE, S., BREUNIG, A., PFEIFFER, P., RADEK, R. & BRUGEROLLE, G. (2007) The flagellates of the Australian termite *Mastotermes darwiniensis*: Identification of their symbiotic bacteria and cellulases. *Symbiosis*, **44**, 51-65.
- KOPTUR, S. (1992) Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. IN Bernays, E. A. (Ed.) *Insect-plant interactions, Vol IV*. Boca Raton, CRC Press.
- KOST, C. & HEIL, M. (2006) Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. *J. Ecol.*, **94**, 619-628.
- KRASSILOV, V. A. & RASNITSYN, A. P. (1996) Pollen in the guts of Permian insects: First evidence of pollinivory and its evolutionary significance. *Lethaia*, **29**, 369-372.
- KUHNIGK, T., BORST, E. M., RITTER, A., KAMPFER, P., GRAF, A., HERTEL, H. & KÖNIG, H. (1994a) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Systematic And Applied Microbiology*, **17**, 76-85.
- KUHNIGK, T., BORST, E. M., RITTER, A., KAMPFER, P., GRAF, A., HERTEL, H. & KÖNIG, H. (1994b) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Syst. Appl. Microbiol.*, **17**, 76-85.
- KUHNIGK, T., BRANKE, J., KREKELER, D., CYPIONKA, H. & KÖNIG, H. (1996) A feasible role of sulfate-reducing bacteria in the termite gut. *Systematic And Applied Microbiology*, **19**, 139-149.
- KUHNIGK, T. & KÖNIG, H. (1997) Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 205-211.
- KUNZ, W. (2002a) Species concepts versus species criteria - Response. *Trends In Parasitology*, **18**, 440-440.
- KUNZ, W. (2002b) When is a parasite species a species? *Trends In Parasitology*, **18**, 121-124.
- KURANOCHI, T., NAKAMURA, T., SHIMAMURA, S., KOJIMA, H., GOKA, K., OKABE, K. & MOCHIZUKI, A. (2006) Nitrogen fixation in the stag beetle, *Dorcus (Macrodorcus) rectus* (Motschulsky) (Col., Lucanidae). *J. Appl. Entomology*, **130**, 471-472. (DOI 10.1111/j.1439-0418.2006.01080.x.)
- LA SCOLA, B., MALLETT, M. N., GRIMONT, P. A. D. & RAOULT, D. (2003) *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**. (DOI 10.1099/ijs.0.02127-0.)
- LADHA, J. K. & REDDY, P. M. (2003) Nitrogen fixation in rice systems: state of knowledge and future prospects. *Plant And Soil*, **252**, 151-167.
- LEADBETTER, J. R. & BREZNAK, J. A. (1996) Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp nov and *Methanobrevibacter curvatus* sp nov, isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3620-3631.
- LEE, I. M., GUNDERSEN-RINDAL, D. E. & BERTACCINI, A. (1998) Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, **88**, 1359-1366.
- LEIGH, M. B., PROUZOVA, P., MACKOVA, M., MACEK, T., NAGLE, D. P. & FLETCHER, J. S. (2006) Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2331-2342.

- LEONARDO, T. E. & MONDOR, E. B. (2006) Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow. *Proc. R. Soc. B*, **273**, 1079-1084. (DOI 10.1098/rspb.2005.3408.)
- LI, H. W., MEDINA, F., VINSON, S. B. & COATES, C. J. (2005) Isolation, characterization, and molecular identification of bacteria from the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*) midgut. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 203-209. (DOI 10.1016/j.jip.2005.05.008.)
- LI, L., FROHLICH, J., PFEIFFER, P. & KÖNIG, H. (2003) Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. *Eukaryotic Cell*, **2**, 1091-1098.
- LITTLE, A. E. F. & CURRIE, C. R. (2007) Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. *Biology Letters*, **3**, 501-504.
- LITTLE, A. E. F. & CURRIE, C. R. (2008) Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. *Ecology*, **89**, 1216-1222.
- LITTLE, A. E. F., MURAKAMI, T., MUELLER, U. G. & CURRIE, C. R. (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters*, **2**, 12-16.
- LLOBET-BROSSA, E., ROSSELLO-MORA, R. & AMANN, R. (1998) Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied And Environmental Microbiology*, **64**, 2691-2696.
- LLORET, L., ORMENO-ORRILLO, E., RINCON, R., MARTINEZ-ROMERO, J., ROGEL-HERNANDEZ, M. A. & MARTINEZ-ROMERO, E. (2007) *Ensifer mexicanus* sp nov a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol.*, **30**, 280-290.
- LOGANATHAN, P. & NAIR, S. (2004) *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1185-1190. (DOI 10.1099/ijs.0.02817-0.)
- LOIRET, F. G., ORTEGA, E., KLEINER, D., ORTEGA-RODES, P., RODES, R. & DONG, Z. (2004) A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp from sugarcane. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 504-511.
- LOUGHRIN, J. H., POTTER, D. A. & HAMILTON-KEMP, T. R. (1995) Volative compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese Beetle (*Popillia japonica* Newman). *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 1457-1467.
- LURSSSEN, K. (1981) The plant hormone Ethylene - Biosynthesis, effect on plants and possibilities for its use. *Chemie In Unserer Zeit*, **15**, 122-129.
- MACKENZIE, L. M., MUIGAI, A. T., OSIR, E. O., LWANDE, W., KELLER, M., TOLEDO, G. & BOGA, H. I. (2007) Bacterial diversity in the intestinal tract of the fungus-cultivating termite *Macrotermes michaelseni* (Sjostedt). *African J. Biotechnol.*, **6**, 658-667.
- MACKO, S. A., ESTEP, M. L. F., ENGEL, M. H. & HARE, P. E. (1986) Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino-acid transamination. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **50**, 2143-2146.
- MAKKAR, N. S. & CASIDA, L. E. (1987) *Cupriavidus necator* gen-nov, sp-nov - a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **37**, 323-326.
- MARCHESI, J. R., SATO, T., WEIGHTMAN, A. J., MARTIN, T. A., FRY, J. C., HIOM, S. J. & WADE, W. G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 795-799.
- MARGULIS, L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **93**, 1071-1076.
- MARTENSSON, A. M. & LJUNGGREN, H. D. (1984) A comparison between the acetylene-reduction method, the isotope-dilution method and the total nitrogen difference

- method for measuring nitrogen-fixation in lucerne (*Medicago sativa* L). *Plant And Soil*, **81**, 177-184.
- MARTIN, M. M. (1992) The evolution of insect-fungus associations - from contact to stable symbiosis. *American Zoologist*, **32**, 593-605.
- MARTINEZ-AGUILAR, L., DIAZ, R., PENA-CABRIALES, J. J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., DUNN, M. F. & CABALLERO-MELLADO, J. (2008) Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4574-4579.
- MATSUKI, Y., TATENO, R., SHIBATA, M. & ISAG, Y. (2008) Pollination efficiencies of flower-visiting insects as determined by direct genetic analysis of pollen origin. *American Journal Of Botany*, **95**, 925-930.
- MAYR, E. (1942) Systematics and the origin of species. *Columbia University Press*.
- MCCAIG, A. E., GRAYSTON, S. J., PROSSER, J. I. & GLOVER, L. A. (2001) Impact of cultivation on characterisation of species composition of soil bacterial communities. *Fems Microbiology Ecology*, **35**, 37-48.
- MCMANUS, P. S., BEST, V. M. & VOLAND, R. P. (1999) Infection of cranberry flowers by *Monilinia oxycocci* and evaluation of cultivars for resistance to cottonball. *Phytopathology*, **89**, 1127-1130.
- MCNEILL, A. M., HOOD, R. C. & WOOD, M. (1994) Direct measurement of nitrogen-fixation by *Trifolium repens* L and *Alnus glutinosa* L using N-15(2). *Journal Of Experimental Botany*, **45**, 749-755.
- MENDES, R., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., ARAUJO, W. L. & RAAIJMAKERS, J. M. (2007) Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7259-7267.
- MERLIN, P., BRAEKMAN, J. C., DALOZE, D. & PASTEELS, J. M. (1988) Tetraponerines, Toxic Alkaloids In The Venom Of The Neo-Guinean Pseudomyrmecine Ant Tetraponera Sp. *Journal Of Chemical Ecology*, **14**, 517-527.
- MIYATA, R., NODA, N., TAMAKI, H., KINJYO, K., AOYAGI, H., UCHIYAMAI, H. & TANAKA, H. (2007) Phylogenetic relationship of symbiotic archaea in the gut of the higher termite *Nasutitermes takasagoensis* fed with various carbon sources. *Microb. Environ.*, **22**, 157-164.
- MOHR, K. I. & TEBBE, C. C. (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environ. Microbiol.*, **8**, 258-272. (DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x.)
- MOHR, K. I. & TEBBE, C. C. (2007) Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 573-582. (DOI 10.1007/s00253-007-0846-7.)
- MORAN, N. A., DEGNAN, P. H., SANTOS, S. R., DUNBAR, H. E. & OCHMAN, H. (2005a) The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *PNAS*, **102**, 16919-16926.
- MORAN, N. A., RUSSELL, J. A., KOGA, R. & FUKATSU, T. (2005b) Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Applied And Environmental Microbiology*, **71**, 3302-3310.
- MOREAU, C. S., BELL, C. D., VILA, R., ARCHIBALD, S. B. & PIERCE, N. E. (2006) Phylogeny of the ants: Diversification in the age of angiosperms. *Science*, **312**, 101-104. (DOI 10.1126/science.1124891.)
- MOYA-RAYGOZA, G. & NAULT, L. R. (1998) Transmission biology of maize bushy stunt phytoplasma by the corn leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **91**, 668-676.

- MUELLER, U. G., SCHULTZ, T. R., CURRIE, C. R., ADAMS, R. M. M. & MALLOCH, D. (2001) The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Quarterly Review Of Biology*, **76**, 169-197.
- MÜHLHARDT, C. (1999) Der Experimentator: Molekularbiologie. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart*.
- NAKANISHI, K., HOSHINO, M., NAKAI, M. & KUNIMI, Y. (2008) Novel RNA sequences associated with late male killing in *Homona magnanima*. *Proc. R. Soc. B*, **275**, 1249-1254. (DOI 10.1098/rspb.2008.0013.)
- NARDI, J. B., MACKIE, R. I. & DAWSON, J. O. (2002) Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? *J. Insect Physiol.*, **48**, 751-763.
- NAVASCASTILLO, J., LAIGRET, F. & BOVE, J. M. (1993) 16S rDNA sequence-analysis of *Acholeplasma seiffertii*, a mollicute from plant-surfaces, and its transfer to *Mesoplasma*, a new genus in the *Spiroplasma* phylogenetic group. *Nucleic Acids Research*, **21**, 2249-2249.
- NEGRI, I., PELLECCIA, M., MAZZOGGIO, P. J., PATETTA, A. & ALMA, A. (2006) Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/XO sex-determination system. *Proc. R. Soc. B*, **273**, 2409-2416. (DOI 10.1098/rspb.2006.3592.)
- NESS, J. H. (2003) *Catalpa bignonioides* alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia*, **134**, 210-218.
- NIEUWLAND, J. A. & VOGT, R. R. (1945) The chemistry of acetylene, Reinhold, New York.
- O'BRIEN, H. E., MIADLIKOWSKA, J. & LUTZONI, F. (2005) Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *Eur. J. Phycol.*, **40**, 363-378.
- OHKUMA, M., IIDA, T. & KUDO, T. (1999a) Phylogenetic relationships of symbiotic spirochetes in the gut of diverse termites. *Fems Microbiology Letters*, **181**, 123-129.
- OHKUMA, M., NODA, S. & KUDO, T. (1999b) Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4926-4934.
- OHKUMA, M., NODA, S. & KUDO, T. (1999c) Phylogenetic relationships of symbiotic methanogens in diverse termites. *Fems Microbiology Letters*, **171**, 147-153.
- OHKUMA, M., NODA, S., USAMI, R., HORIKOSHI, K. & KUDO, T. (1996) Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2747-2752.
- OHKUMA, M., SATO, T., NODA, S., UI, S., KUDO, T. & HONGO, Y. (2007) The candidate phylum 'Termite Group 1' of bacteria: phylogenetic diversity, distribution, and endosymbiont members of various gut flagellated protists. *Fems Microbiology Ecology*, **60**, 467-476.
- OLIVEIRA, P. S. & FREITAS, A. V. L. (2004) Ant-plant-herbivore interactions in the neotropical cerrado savanna. *Naturwissenschaften*, **91**, 557-570.
- OLSEN, K. N., HENRIKSEN, M., BISGAARD, M., NIELSEN, O. L. & CHRISTENSEN, H. (2008) Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Of General And Molecular Microbiology*, **94**, 423-437.
- ONEILL, S. L., GIORDANO, R., COLBERT, A. M. E., KARR, T. L. & ROBERTSON, H. M. (1992) 16S ribosomal-RNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2699-2702.
- OVALLE, C., LONGERI, L., ARONSON, J., HERRERA, A. & AVENDANO, J. (1996) N<sub>2</sub>-Fixation, nodule efficiency and biomass accumulation after two years in three Chilean legume

- trees and Tagasaste *Chamaecytisus proliferus subsp. palmensis*. *Plant and Soil*, **179**, 131-140.
- PACE, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, **276**, 734-740.
- PAN, B., VESSEY, J. K. & SMITH, D. L. (2002a) Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. *European Journal Of Agronomy*, **17**, 143-153.
- PAN, J. Z., HINK, W., KUROSKY, A., XU, B., HAAG, A., LIANG, X. L. & BARON, S. (2002b) Anti-angiogenic potential of a venom extract from the ant *Pseudomyrmex triplarinus*: functional and biochemical characterizations. *Faseb Journal*, **16**, A214-A214.
- PAN, J. Z. & HINK, W. F. (2000) Isolation and characterization of myrmexins, six isoforms of venom proteins with anti-inflammatory activity from the tropical ant, *Pseudomyrmex triplarinus*. *Toxicon*, **38**, 1403-1413.
- PARK, B. K., KIM, M. J., KIM, E. H., KIM, M. S., NA, D. G. & CHAE, J. S. (2003) Identification of trematode cercariae carrying *Neorickettsia risticii* in freshwater stream snails. *Rickettsiology: Present And Future Directions*.
- PERLMAN, S. J., HUNTER, M. S. & ZCHORI-FEIN, E. (2006) The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **273**, 2097-2106.
- PETERS, G. A. (1991) *Azolla* and other plant-cyanobacteria symbioses - Aspects of form and function. *Plant And Soil*, **137**, 25-36.
- PFEIFFER, M. & LINSSENMAIR, K. E. (2000) Contributions to the life history of the Malaysian giant ant *Camponotus gigas* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, **47**, 123-132.
- PITTMAN, G. W., BRUMBLEY, S. M., ALLSOPP, P. G. & O'NEILL, S. L. (2008) "Endomicrobia" and other bacteria associated with the hindgut of *Dermolepida albobirtum* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 762-767.
- POINAR, G. O. J. & THOMAS, G. M. (1966) Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitol.*, **56**, 385-390.
- POINTIN, A. J. (1978) The numbers and distributions of subterranean aphids and their exploitation by the ant *Lasius flavus* (Fabr.). *Ecological Entomology*, **3**, 203-207.
- POST, D. M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology*, **83**, 703-718.
- POTRIKUS, C. J. & BREZNAK, J. A. (1977) Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 392-399.
- POULSEN, M., BOT, A. N. M., CURRIE, C. R. & BOOMSMA, J. J. (2002) Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Insectes Sociaux*, **49**, 15-19.
- POULSEN, M., CAFARO, M., BOOMSMA, J. J. & CURRIE, C. R. (2005) Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Molecular Ecology*, **14**, 3597-3604.
- RAMIREZ-MORENO, S., MARTINEZ-ALONSO, M. R., MENDEZ-ALVAREZ, S., ESTEVE, I. & GAJU, N. (2003) Seasonal population changes in the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns from PCR-amplified 16S rRNA genes of predominant ribotypes in microbial mat samples from the Ebro Delta (Spain). *Current Microbiology*, **46**, 190-198.
- RASNITSYN, A. P. & KRASSILOV, V. A. (1996) First finding of pollen in intestines of Lower Permian insects. *Paleontologicheskii Zhurnal*, 119-124.
- RICKSON, F. R. (1971) Glycogen plastids in Müllerian body cells of *Cecropia peltata* - a higher green plant. *Science*, **173**, 344-347.



- RICKSON, F. R. (1980) Developmental anatomy and ultrastructure of the ant-food bodies (Beccarian bodies) of *Macaranga triloba* and *M. hypoleuca* (Euphorbiaceae). *American Journal Of Botany*, **67**, 285-292.
- RICO-GRAY, V. (1993) Use of plant-derived food resources by ants in the dry tropical lowlands of coastal Veracruz, Mexico. *Biotropica*, **25**, 301-315.
- RIVAS, R., WILLEMS, A., SUBBA-RAO, N. S., MATEOS, P. F., DAZZO, F. B., KROPPESTEDT, R. M., MARTÍNEZ-MOLINA, E., GILLIS, M. & VELÁZQUEZ, E. (2003) Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 47-53.
- ROGEL, M. A., HERNANDEZ-LUCAS, I., KUYKENDALL, L. D., BALKWILL, D. L. & MARTINEZ-ROMERO, E. (2001) Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3264-3268.
- ROLAND, A. W. & BRAND, W. A. (2001) Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **15**, 501-519.
- RÖSCH, C. & BOTHE, H. (2005) Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **Vol. 71, No. 4**, 2026-2035. (DOI 10.1128/AEM.71.4.2026-2035.2005.)
- RÖSCH, C., EILMUS, S. & BOTHE, H. (2006) Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. *Biochem. Society Transactions*, **34**, 169-173.
- RUPPEL, S. & MERBACH, W. (1995) Effects of different nitrogen sources on nitrogen fixation and bacterial growth of *Pantoea agglomerans* and *Azospirillum* sp in bacterial pure culture: An investigation using N-15(2) incorporation and acetylene reduction measures. *Microbiological Research*, **150**, 409-418.
- RUPPEL, S. & MERBACH, W. (1997) Effect of ammonium and nitrate on N-15(2)-fixation of *Azospirillum* spp. and *Pantoea agglomerans* in association with wheat plants. *Microbiological Research*, **152**, 377-383.
- RUSSELL, J. A. & MORAN, N. A. (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. R. Soc. B*, **273**, 603-610. (DOI 10.1098/rspb.2005.3348.)
- SAGERS, C. L., GINGER, S. M. & D. EVANS, R. (2000) Carbon and nitrogen isotopes trace nutrient exchange in an ant-plant mutualism. *Oecologia*, **123**, 582-586.
- SAMESHIMA, S., HASEGAWA, E., KITADE, O., MINAKA, N. & MATSUMOTO, T. (1999) Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. *Zool. Sci.*, **16**, 993-1000.
- SANTOS, A. V., DILLON, R. J., DILLON, V. M., REYNOLDS, S. E. & SAMUELS, R. I. (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **238**, 319-323. (DOI 10.1016/j.femsle.2004.09.005.)
- SARA, M., BAVESTRELLO, G., CATTANEO-VIETTI, R. & CERRANO, C. (1998) Endosymbiosis in sponges: Relevance for epigenesis and evolution. *Symbiosis*, **25**, 57-70.
- SAUER, C., DUDACZEK, D., HÖLLDOBLER, B. & GROSS, R. (2002) Tissue localization of the endosymbiotic bacterium "*Candidatus Blochmannia floridanus*" in adults and larvae of the carpenter Ant *Camponotus floridanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68, No. 9**, 4187-4193.
- SAUER, C., STACKEBRANDT, E., GADAU, J., HÖLLDOBLER, B. & GROSS, R. (2000) Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus Blochmannia* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, **50**, 1877-1886.

- SCHÄFER, A., KONRAD, R., KUHNIGK, T., KAMPFER, P., HERTEL, H. & KÖNIG, H. (1996) Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. *J. Appl. Bacteriology*, **80**, 471-478.
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. (2004) Status of the microbial census. *MMBR*, **68**, 686-+. (DOI 10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004.)
- SCHULTZ, D. R. & ARNOLD, P. I. (1977) Venom of ant *Pseudomyrmex* sp - further characterization of 2 factors that affect human complement proteins. *Journal Of Immunology*, **119**, 1690-1699.
- SCHULTZ, D. R., ARNOLD, P. I., WU, M. C., LO, T. M., VOLANAKIS, J. E. & LOOS, M. (1979) Isolation and partial characterization of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp) that activates the classical complement pathway. *Molecular Immunology*, **16**, 253-264.
- SCHULTZ, D. R., ARNOLD, P. I., WU, M. C. & VOLANAKIS, J. E. (1978) Studies of a polysaccharide in ant venom (*Pseudomyrmex* sp) that activates classical complement-(C) pathway. *Journal Of Immunology*, **120**, 1797-1797.
- SCHULTZ, T. R. (2000) In search of ant ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 14028-14029.
- SCHUTTE, U. M. E., ABDO, Z., BENT, S. J., SHYU, C., WILLIAMS, C. J., PIERSON, J. D. & FORNEY, L. J. (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 365-380.
- SHANNON, B. T. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, **27**, 379-423 und 623-656.
- SHELTON, T. G. & GRACE, I. K. (2003) Termite physiology in relation to wood degradation and termite control. *Wood Deterioration And Preservation - Advances In Our Changing World*, **845**, 242-252.
- SHINZATO, N., MURAMATSU, M., MATSUI, T. & WATANABE, Y. (2007) Phylogenetic analysis of the gut bacterial microflora of the fungus-growing termite *Odontotermes formosanus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 906-915.
- SINGH, B. K., NAZARIES, L., MUNRO, S., ANDERSON, I. C. & CAMPBELL, C. D. (2006) Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 7278-7285.
- SMITH, D. L. & HUME, D. J. (1987) Comparison of assay-methods for N-2 fixation utilizing white bean and soybean. *Canadian Journal Of Plant Science*, **67**, 11-19.
- SRÁMOVÁ H, D. M., ABSOLONOVÁ V, DEDICOVÁ D, JEDLICKOVÁ Z, LHOVÁ H, PETRÁS P, SUBERTO V. (1992) Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *J. Hosp. Infect.*, **20**, 281-292.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriology*, **44**, 846-849.
- STADLER, B. & DIXON, A. F. G. (2005) Ecology and evolution of aphid-ant interactions. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **36**, 345-372.
- STALEY, J. T. (2002) A microbial perspective of biodiversity. *in: Biodiversity of microbial life: Foundation of Earth's Biosphere*. J. T. Staley und A.-L. Reysenbach. New York, Wiley-Liss: 3-23.
- STINGL, U., MAASS, A., RADEK, R. & BRUNE, A. (2004) Symbionts of the gut flagellate *Staurojoenina* sp. from *Neotermes cubanus* represent a novel, termite-associated lineage of Bacteroidales: description of '*Candidatus Vestibaculum illigatum*'. *Microbiology-Sgm*, **150**, 2229-2235.

- STOLL, S., GADAU, J., GROSS, R. & FELDHAAR, H. (2007) Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. *Biol. J. Linn. Soc.*, **90**, 399-412.
- SUAREZ-MORENO, Z. R., CABALLERO-MELLADO, J. & VENTURI, V. (2008) The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology-Sgm*, **154**, 2048-2059.
- TAERUM, S. J., CAFARO, M. J., LITTLE, A. E. F., SCHULTZ, T. R. & CURRIE, C. R. (2007) Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **274**, 1971-1978.
- TAYASU, I. (1998) Use of carbon and nitrogen isotope ratios in termite research. *Ecological Research*, **13**, 377-387.
- THALER, J. S. (1999) Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature*, **399**, 686-688.
- THEBAUD, G., YVON, M., LABONNE, G. & ALARY, R. (2008) European stone fruit yellows: Consequences of the life cycle of the vector and of the multiplication of the *Phytoplasma* in the insect on the epidemiology of the disease. *Proceedings Of The Twentieth International Symposium On Virus And Virus-Like Diseases Of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases*, 423-428.
- TOBIN, J. E. (1995) Ecology and diversity of tropical forest canopy ants. IN Lowman, M. D. & Nadkarni, N. M. (Eds.) *Forest canopies*. San Diego, CA, Academic Press.
- TOLEDO, I., LLORET, L. & MARTINEZ-ROMERO, E. (2003) *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Syst Appl Microbiol.*, **26**(1), 54-64.
- TRANVAN, V., MAVINGUI, P., BERGE, O., BALANDREAU, J. & HEULIN, T. (1994) Growth promotion of rice after inoculation with a nitrogen-fixing bacteria *Burkholderia vietnamiensis* isolated from an acid-sulfate soil in Vietnam. *Agronomie*, **14**, 697-707.
- TRENCH, R. K. (1993) Microalgal-Invertebrate Symbioses - A Review. *Endocytobiosis And Cell Research*, **9**, 135-175.
- TRIPATHI, A. K., VERMAL, S. C., CHOWDHURY, S. P., LEBUHN, M., GATTINGER, A. & SCHLOTER, M. (2006) *Ochrobactrum oryzae* sp. nov., an endophytic bacterial species isolated from deep-water rice in India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 1677-1680. (DOI 10.1099/ijls.0.63934-0.)
- TULLY, J. G., WHITCOMB, R. F., HACKETT, K. J., ROSE, D. L., HENEGAR, R. B., BOVE, J. M., CARLE, P., WILLIAMSON, D. L. & CLARK, T. B. (1994) Taxonomic Descriptions Of 8 New Non-Sterol-Requiring Mollicutes Assigned To The Genus *Mesoplasma*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **44**, 685-693.
- TULLY, J. G., WHITCOMB, R. F., HACKETT, K. J., WILLIAMSON, D. L., LAIGRET, F., CARLE, P., BOVE, J. M., HENEGAR, R. B., ELLIS, N. M., DODGE, D. E. & ADAMS, J. (1998) *Entomoplasma freundtii* sp. nov., a new species from a green tiger beetle (Coleoptera: Cicindelidae). *International Journal Of Systematic Bacteriology*, **48**, 1197-1204.
- TUN, C. C., IKENAGA, M., ASAKAWA, S. & KIMURA, M. (2002) Community structure of bacteria and fungi responsible for rice straw decomposition in a paddy field estimated by PCR-RFLP analysis. *Soil Science And Plant Nutrition*, **48**, 805-813.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. (2007) The Human Microbiome Project. *Nature*, **449**, 804-810.
- USHER, K. M., BERGMAN, B. & RAVEN, J. A. (2007) Exploring cyanobacterial mutualisms. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **38**, 255-273.
- VAN BORM, S., BILLEN, J. & BOOMSMA, J. J. (2002a) The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evol. Biol.*, **2**:9, 1-11. (Doi10.1186/1471-2148-2-9.)

- VAN BORM, S., BUSCHINGER, A., BOOMSMA, J. J. & BILLEN, J. (2002b) *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **269**, 2023-2027. (DOI 10.1098/rspb.2002.2101.)
- VAN BORM, S., WENSELEERS, T., BILLEN, J. & BOOMSMA, J. J. (2001) *Wolbachia* in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. *J. Evol. Biol.*, **14**, 805-814.
- VARGAS, M., KASHEFI, K., BLUNT-HARRIS, E. L. & LOVLEY, D. R. (1998) Microbiological evidence for Fe(III) reduction on early Earth. *Nature*, **395**, 65-67.
- VARMA, A., KOLLI, B. K., PAUL, J., SAXENA, S. & KÖNIG, H. (1994) Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts - a survey on the present state-of-art. *Fems Microbiology Reviews*, **15**, 9-28.
- VASCONCELOS, H. L. & DAVIDSON, D. W. (2000) Relationship between plant size and ant associates in two Amazonian ant-plants. *Biotropica*, **32**, 100-111.
- WANG, B. & QIU, Y. L. (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, **16**, 299-363.
- WANG, Q., GARRITY, G. M., TIEDJE, J. M. & COLE, J. R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5261-5267.
- WARD, P. S. (1993) Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae). *J. Hymenopteran Research*, **2**, 117-168.
- WARD, P. S. & DOWNIE, D. A. (2005) The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology*, **30**, 310-335.
- WARNECKE, F., LUGINBUHL, P., IVANOVA, N., GHASSEMIAN, M., RICHARDSON, T. H., STEGE, J. T., CAYOUE, M., MCHARDY, A. C., DJORDJEVIC, G., ABOUSHADI, N., SOREK, R., TRINGE, S. G., PODAR, M., MARTIN, H. G., KUNIN, V., DALEVI, D., MADEJSKA, J., KIRTON, E., PLATT, D., SZETO, E., SALAMOV, A., BARRY, K., MIKHAILOVA, N., KYRPIDES, N. C., MATSON, E. G., OTTESEN, E. A., ZHANG, X. N., HERNANDEZ, M., MURILLO, C., ACOSTA, L. G., RIGOUTSOS, I., TAMAYO, G., GREEN, B. D., CHANG, C., RUBIN, E. M., MATHUR, E. J., ROBERTSON, D. E., HUGENHOLTZ, P. & LEADBETTER, J. R. (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, **450**, 560-U17.
- WAY, M. J. (1962) Mutualism between ants and honeydew-producing homoptera.
- WAY, M. J. & KHOO, K. C. (1992) Role of ants in pest management. *Annual Review of Entomology*, **37**, 479-503.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703.
- WENSELEERS, T. & BILLEN, J. (2000) No evidence for *Wolbachia*-induced parthenogenesis in the social Hymenoptera. *J. Evol. Biol.*, **13**, 277-280.
- WENSELEERS, T., ITO, F., VAN BORM, S., HUYBRECHTS, R., VOLCKAERT, F. & BILLEN, J. (1998) Widespread occurrence of the microorganism *Wolbachia* in ants. *Proc. R. Soc. B*, **265**, 1447-1452.
- WENSELEERS, T., SUNDSTROM, L. & BILLEN, J. (2002) Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. *Proc. R. Soc. B*, **269**, 623-629. (DOI 10.1098/rspb.2001.1927.)
- WENZEL, M., SCHONIG, I., BERCHTOLD, M., KAMPFER, P. & KÖNIG, H. (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 32-40.
- WERTZ, J. T. & BREZNAK, J. A. (2007) *Stenoxybacter acetivorans* gen. nov., sp nov., an acetate-oxidizing obligate microaerophile among diverse O<sub>2</sub>-consuming bacteria from termite guts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6819-6828.

- WEST, S. A., KIERS, E. T., SIMMS, E. L. & DENISON, R. F. (2002) Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proc. R. Soc. B*, **269**, 685-694.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1972) The principles of insect physiology. 494-552.
- WILLEMS, A., FALSEN, E., POT, B., JANTZEN, E., HOSTE, B., VANDAMME, P., GILLIS, M., KERSTERS, K. & DELEY, J. (1990) *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E-Falsen (Ef) group 13, Ef group 16, and several clinical isolates with the species *Acidovorax facilis* comb-nov, *Acidovorax delafieldii* comb-nov and *Acidovorax temperans* sp-nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 384-398.
- WILSON, M. (2005) Microbial inhabitants of humans - their ecology and role in health and disease. *Cambridge University Press, New York*.
- WILSON, M. & LINDOW, S. E. (1993) Interactions between the biological-control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology*, **83**, 117-123.
- WIVSTAD, M., MARTENSSON, A. M. & LJUNGGREN, H. D. (1987) Field measurement of symbiotic nitrogen-fixation in an established lucerne ley using N-15 and an acetylene-reduction method. *Plant And Soil*, **97**, 93-104.
- WOESE, C. R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, **51**, 221-271.
- WOLFE, D. S. (2001) Tales from the underground: A natural history of subterranean life, Perseus Books, New York., 75-92.
- WOLSCHIN, F., HOLDOBLER, B., GROSS, R. & ZIENTZ, E. (2004) Replication of the endosymbiotic bacterium *Blochmannia floridanus* is correlated with the developmental and reproductive stages of its ant host. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4096-4102. (DOI 10.1125/AEM.70.7.4096-4102.2004.)
- WOLSING, M. & PRIEME, A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *Fems Microbiology Ecology*, **48**, 261-271.
- WOODRING, J., WIEDEMANN, R., FISCHER, M. K., HOFFMANN, K. H. & VOLKL, W. (2004) Honeydew amino acids in relation to sugars and their role in the establishment of ant-attendance hierarchy in eight species of aphids feeding on tansy (*Tanacetum vulgare*). *Physiological Entomology*, **29**, 311-319.
- XU, J., MAHOWALD, M. A., LEY, R. E., LOZUPONE, C. A., HAMADY, M., MARTENS, E. C., HENRISSAT, B., COUTINHO, P. M., MINX, P., LATREILLE, P., CORDUM, H., VAN BRUNT, A., KIM, K., FULTON, R. S., FULTON, L. A., CLIFTON, S. W., WILSON, R. K., KNIGHT, R. D. & GORDON, J. I. (2007) Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *Plos Biology*, **5**, 1574-1586.
- YAO, I. & AKIMOTO, S. I. (2002) Flexibility in the composition and concentration of amino acids in honeydew of the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. *Ecological Entomology*, **27**, 745-752.
- YI, H., CHANG, Y. H., OH, H. W., BAE, K. S. & CHUN, J. (2003) *Zooshikella ganghwensis* gen. nov., sp. nov., isolated from tidal flat sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1013-1018. (DOI 10.1099/ijss.0.02521-0.)
- YOUNG, J. M. (2003) The genus name *Ensifer casida* 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982 Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**(6), 2107-2110.
- YOUNG, T. P., STUBBLEFIELD, C. H. & ISBELL, L. A. (1997) Ants on swollen-thorn acacias: species coexistence in a simple system. *Oecologia*, **109**, 98-107.
- YUEN, K. Y., WOO, P. C. Y., TENG, J. L. L., LEUNG, K. W., WONG, M. K. M. & LAU, S. K. P. (2001) *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium

- isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4227-4232.
- ZANNOLLI, R. & MORGESE, G. (1995) New pathogens, and diseases old and new. 1. *Afipia felis* and *Rochalimaea*. 2. *Parvovirus B 19*. 3. *Herpesvirus 6*. *Panminerva Med.*, **37**, 238-247.
- ZAR, J. H. (1996) Biostatistical Analysis. Prentice Hall. Sect 13.3, pp. 282-283.
- ZHANG, M. M., POULSEN, M. & CURRIE, C. R. (2007) Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *ISME J.*, **1**, 313-320. (DOI 10.1038/ismej.2007.41.)
- ZIEGLER, H. & PENTH, S. (1977) Contribution to knowledge of honeydew-composition. *Apidologie*, **8**, 419-426.
- ZIENTZ, E., BEYAERT, N., GROSS, R. & FELDHAAR, H. (2006) Relevance of the endosymbiosis of *Blochmannia floridanus* and carpenter ants at different stages of the life cycle of the host. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6027-6033. (DOI 10.1128/AEM.00933-06.)
- ZIENTZ, E., DANDEKAR, T. & GROSS, R. (2004) Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 745-770. (DOI 10.1128/MMBR.68.4.745-770.2004.)
- ZIENTZ, E., FELDHAAR, H., STOLL, S. & GROSS, R. (2005) Insights into the microbial world associated with ants. *Arch. Microbiol.*, **184**, 199-206. (DOI 10.1007/s00203-005-0041-0.)

## 7 Anhang

### 7.1 Positionsdaten der Proben

**Tabelle 7.1: Liste GPS-Koordinaten: Ameisen- und Pflanzenproben.**

Für die Probenahmestellen von *P. gracilis* und *P. ferrugineus* wird jeweils nur eine exemplarische GPS-Koordinate für den gesamten Standort angegeben. Das Sammeldatum wird angegeben, sofern die jeweilige Stelle nur einmalig besammelt wurde. Die anderen Stellen wurden über den Zeitraum des Feldaufenthalt kontinuierlich besammelt. Die relative allgemeine Fehler der GPS-Positionsbestimmung liegt bei  $\pm 12 \text{ m} = \pm 39,37 \text{ ft}$  (<http://www.kowoma.de/gps/Fehlerquellen.htm>); Gerät: Garmin GPS 60 (Garmin, Gräfelfing). UMAR = Gelände der Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido.

Art	Fundort	GPS Koordinaten	Genauigkeit (ft)	Höhe über Meeresspiegel (ft)
<b>Ameisen</b>				
<i>Pseudomyrmex ferrugineus</i>	UMAR Iguana-Farm, Highway km 132 außerhalb Puerto Escondido	N15°55.608 W97°09.053	$\pm 21$	40
<i>P. ferrugineus</i>	Strandwald: Bacocho, Puerto Escondido	N15°52.000 W97°05.480	$\pm 18$	54
<i>P. ferrugineus</i>	UMAR	N15°53.387 W97°04.595	$\pm 18$	190
<i>P. ferrugineus</i> , 20.08.07	<i>A. chiapensis</i> -Standort, Matias Romero	N17°06.034 W94°55.823	$\pm 19$	472
<i>P. gracilis</i>	Highway ca. km 136, Puerto Escondido	N15°54.351 W97°07.063	$\pm 32$	64
<i>P. gracilis</i>	Strandwald: Bacocho, Puerto Escondido	N15°52.024 W097°05.414	$\pm 18$	54
<i>P. gracilis</i>	UMAR	N15°53.426 W97°04.492	$\pm 20$	195
<i>P. gracilis</i> , 20.08.07	<i>A. chiapensis</i> -Standort, Matias Romero	N17°06.044 W94°55.821	$\pm 27$	481
<i>P. salvini</i> , 07.10.07	Biostation bei Los Tuxtlas	N18°35.180 W95°04.437	$\pm 31$	389
<i>P. salvini</i> , 10.09.07	Landstraße bei Matias Romero	N17°00.629 W95°00.988	$\pm 15$	307
<b>Akazien</b>				
<i>Acacia chiapensis</i> , 20.08.07	Knöllchen und Blattproben, Matias Romero	N17°06.034 W94°55.823	$\pm 19$	472
<i>A. cochliacantha</i>	Knöllchen und Blattproben, Puerto, Highway km 103 außerhalb von Escondido	N15°57.529 W97°20.657	$\pm 31$	163

<i>A. cochliacantha</i>	Blätter, UMAR	N15°53.386 W97°04.495	± 18	195
<i>A. collinsii</i> , 27.08.07	Knöllchen und Blattproben, Puerto, Highway km 103 außerhalb von Escondido	N15°57.469 W97°20.708	± 23	122
<i>A. collinsii</i>	Blätter, UMAR	N15°53.387 W97°04.595	± 18	190
<i>A. cornigera</i> , 31.08.07	Knöllchen und Blattproben, UMAR Iguana-Farm, Highway km 132 außerhalb Puerto Escondido	N15°55.585 W97°09.215	± 28	20
<i>A. cornigera</i>	Blätter, UMAR	N15°53.387 W97°04.595	± 18	190
<i>A. farnesiana</i>	Strandwald: Bacocho, Puerto Escondido	N15°52.018 W97°05.387	± 28	56
<i>A. farnesiana</i>	Blätter, UMAR	N15°53.425 W97°04.491	± 20	196
<i>A. hindsii</i> , 27.08.07	Knöllchen und Blattproben, Strandwald: Bacocho, Puerto Escondido	N15°51.982 W97°05.283	± 18	54
<i>A. hindsii</i>	Blätter, UMAR	N15°53.387 W97°04.595	± 18	190
<i>A. macracantha</i>	Knöllchen und Blattproben, UMAR	N15°53.426 W97°04.492	± 20	195



## 7.2 Auflistung aller verwendeten Lösungen

### **Ampicillin-Stammlösung:**

50 mg/mL (anschließend steril filtrieren\*)

Verwendung: 100 µL Ampicillin auf 100 mL Kulturmedium (1:1.000).

Die Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

---

### **BD I**

9,0 g/l Glucose

25 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

---

### **BD II**

10,0 g/L SDS

8,0 g/L NaOH (200 mM)

---

### **BD III**

294 g/L Kaliumacetat (3,0 M)

(pH-Wert mit Eisessig auf 4,8 eingestellt)

---

### **Bisphosphat-PBS (*phosphate buffered saline*)**

1X PBS plus 44,6 g/L tetra-Natriumdiphosphat (= 0,1 molar)

PBS/Bisphosphat-PBS vor Gebrauch autoklavieren oder steril filtrieren.

Lösungen: Siehe PBS

---

### **Insektenringerlösung**

7,5. g. NaCl

0,35. g. KCl

0,21. g. CaCl

1.000 ml destilliertes Wasser

Einstellung des pH auf 7

---

### **IPTG-Stammlösung:**

1 g IPTG pro 4 mL H<sub>2</sub>O (anschließend steril filtrieren\*)

Verwendung: 20 µL IPTG auf 100 mL Kulturmedium (1:5.000).

Die Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

---

### **PBS (*phosphate buffered saline*)**

PBS (10X; 0.1M PBS, pH 7,2)

10,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

90 g NaCl

1000 ml destilliertes Wasser

Einstellen auf pH 7,0.

Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden und wird bei Bedarf 1:10 verdünnt und autoklaviert.

---

**TAE-Puffer**

50x TAE-(Tris-Acetat-EDTA) Puffer:

2 M Trishydroxymethylaminomethan (Tris; Sigma, St. Louis, USA)

1 M Natriumacetat

50 mM EDTA

Einstellen auf pH 7,5 (HCl, verd.).

---

**TfB1 (100 mL)**

1,21 g  $\text{RbCl}_2$

990 mg  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$

200 mg KAc

150 mg  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure

steril filtrieren und bei 4 °C lagern

---

**TfB2 (20 mL)**

24,2 mg  $\text{RbCl}_2$

220 mg  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

3 mL Glycerin (100 %)

42 mg MOPS

pH 7,0 mit NaOH

steril filtrieren und bei 4 °C lagern

---

**Ψb-Medium (1L)**

20 g Bacto Trypton (Roth, Karlsruhe)

5 g Bacto Hefeextrakt (AppliChem, Darmstadt)

4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,75 g KCl

pH auf 7,6 mit 1 M KOH eingestellt; anschließend autoklaviert.

---

**X-Gal-Stammlösung:**

20 mg X-Gal pro 1 mL Dimethylformamid

Verwendung: 100 µL X-Gal auf 100 mL Kulturmedium (1:1.000).

Die Stammlösung wurde bei -20 °C aufbewahrt.

\*) mit einer sterilen Einweg-Spritze aufgezogen und anschließend durch eine Filtermembran „Acrodisc® Syringe Filters“ (25 mm; 0,2 µm; Pall Corporation, Ann Arbor, USA) gedrückt und aliquotiert.

### 7.3 Arthropoda: *Pseudomyrmex salvini*

Arthropoda 16(3): 2008; S.34-37

*Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) – Bemerkungen zur Biologie und Haltung einer kaum bekannten mesoamerikanischen Knotenameise (Pseudomyrmecinae)

*Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) – Notes on Biology and Keeping in Captivity (Pseudomyrmecinae)

Dipl.-Biol. Sascha Eilmus

Allgemeine Botanik, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstrasse 5, D-45141 Essen, Germany; E-Mail: sascha@eilmus.de; © Sascha Eilmus

**Zusammenfassung:** Bei *Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) handelt es sich um eine Baum bewohnende Ameise Mesoamerikas, die bisher nur aus der Umgebung des Volcáno San Martin bei Los Tuxtlas in Veracruz, Mexiko bekannt war. Als neuen Fundort kann in dieser Arbeit Matias Romero am Isthmus von Tehuantepec, Oaxaca, Mexiko angegeben werden. Es werden zudem Bemerkungen zu Beobachtungen des Verhaltens aus freier Natur und der Haltung im Labor gegeben. Demnach scheinen arboreale Ameisen wie *P. salvini* als opportunistische, nicht räuberische Allesfresser zu leben, die sich überwiegend von primär (Nektar, extrafloraler Nektar) oder sekundär pflanzlicher Kost (Honigtau von Pflanzensaugern) ernähren. Abschließend wird noch auf eine erstaunliche Batesische Mimikry der *P. salvini* durch eine Springspinne der Gattung *Synemosyna* (Hentz 1846) hingewiesen.

Abstract: The mesoamerican arboreal ant *Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) was so far only described from Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Estación de Biología Tropical de la UNAM, Volcáno San Martin), Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. A novel location for this rare ant species has been found during an expedition 2007 in the vicinity of Matias Romero at the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. Notes on the sample site and the behaviour of *P. salvini* in nature and captivity were given. According to that arboreal ants such as *P. salvini* seem to live as opportunistic non-predatory omnivores which utilise particularly plant driven food sources (nectar, honey dew). Additionally a remarkable example for a batesian mimicry of a jumping spider of the genus *Synemosyna* (Hentz 1846) imitating *P. salvini* has been given.

**Schlüsselwörter:** *Pseudomyrmex salvini*, Mexiko, Verhalten, Haltung, Batesische Mimikry

**Keywords:** *Pseudomyrmex salvini*, Mexiko, behaviour, keeping in captivity, Batesian mimicry

**Einleitung:** Während eines dreimonatigen Forschungsaufenthaltes in den Monaten August, September und Oktober des Jahres 2007 (Regenzeit) konnte der Autor im mexikanischen Bundesstaat Veracruz Knotenameisen der Gattung *Pseudomyrmex* am natürlichen Standort beobachten und besammeln. Das Klimadiagramm für das von Los Tuxtlas (an der Küste des Golfs vom Mexiko; <http://www.top-wetter.de>) nur ca. 80 km entfernte Coatzacoalcos (Veracruz-Llave) zeigt eine nur kurze Trockenzeit von Februar bis April. Mit meist deutlich über 200 mm (mitunter bis 500 mm) Niederschlägen pro Monat ist der Rest des Jahres stets sehr feucht, was ein ausgeprägtes Pflanzenwachstum mit typischen Vertretern feucht-neotropischer Breiten bedingt.

Die neotropische Ameisengattung *Pseudomyrmex* vereint gegenwärtig ca. 200 Arten arboreale (Baum bewohnender) Ameisenarten, die sich durch verhältnismäßig große Komplexaugen und einen Giftstachel auszeichnen (Ward and Downie 2005, Ward 1993). Eine weitere neotropische Gattung der Unterfamilie Pseudomyrmecinae mit nur 2 beschriebenen Arten ist *Myrcidris*; altweltlich wird die Gruppe durch die Gattung *Tetraponera* mit über 100 Arten vertreten (Ward and Downie 2005). Bekannt wurden besonders jene Arten der Gattung, die als „Pflanzenameisen“ enge Beziehungen (Mutualismen) zu bestimmten myrmekophytischen Arten der neotropischen Akazien eingehen. Diese Ameisen (z. B. *Pseudomyrmex ferrugineus*, *P. mixtecus*, *P. peperi* u. a.) sind auf die Ernährung durch die Ameisenakazien (z. B. *Acacia chiapensis*, *A. collinsii*, *A. cornigera*, *A. hindsii* u. a.) mit extrafloralem Nektar und Futterkörperchen (Belt'sche-Körperchen) angewiesen (Janzen 1966, Janzen 1967). In den büffelhornartig bis blasenartig aufgetriebenen Stipulardornen nisten diese Ameisen. Im Gegenzug verteidigen die Akazienameisen ihre Wirtspflanze gegen Herbivore und aufkommende Konkurrenzvegetation. In Südamerika kommen einige weitere *Pseudomyrmex*-Arten vor, die noch mit weiteren Pflanzen (z. B. *P. viduus* und *P. triplarinus* mit *Triplaris* sp.) mutualistische Beziehungen eingegangen sind (Ward 1999). Einige weitere Arten der Gattung (*P. nigropilosus*, *P. gracilis*) haben sich wiederum darauf spezialisiert, diese Ameisenakazien zu parasitieren (Janzen 1975, Clement *et al.* 2008). Die meisten *Pseudomyrmex*-Arten leben jedoch als arboreale, omnivore Generalisten. Über deren Lebensweise ist jedoch nur sehr wenig bekannt. Dieser Artikel soll deshalb die in ihrer Lebensweise praktisch völlig unbekannte *Pseudomyrmex salvini* (Forel, 1899) aus dem Süden Mexikos behandeln.

**Beschreibung:** Die Arbeiterinnen von *P. salvini* zeichnen sich durch eine recht auffällige Körperfärbung aus. Während der Kopf schwarz gefärbt ist, sind Thorax, Beine und Abdomen auffallend orange gefärbt. Da es sich um eine stachelbewehrte Ameise handelt, ist anzunehmen, dass die relativ auffallende Färbung durchaus der Warnung gegenüber Fressfeinden dient. Die Arbeiterinnen bringen es auf eine Gesamtkörperlänge von 7 mm bis 8 mm (Gemessen an den Wildfängen wie an Arbeiterinnen, die erst im Labor geschlüpft sind). Die weiblichen geflügelten Geschlechtstiere erreichen eine Körperlänge von 9 mm. Anfang September 2007 befanden sich am natürlichen Standort in Los Tuxtlas viele weibliche geflügelte Geschlechtstiere in den besammelten Kolonien. Mit Ende August 2008 schwärmten auch erste männliche Geschlechtstiere (Drohnen) aus der Laborkolonie aus. Es ist daher möglich, dass die Monate August, September und vielleicht noch Oktober am besammelten Standort den natürlichen Zeitraum für das Ausschwärmen der Alate dieser Art darstellt.

Fundort: Straße zur Biologischen Station des Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (Estación de Biología Tropical de la UNAM; Volcáno San Martin; Universidad Nacional Autónoma de México) Richtung Monte Pio. Unmittelbar bevor man aus Richtung Catemaco kommend die biologische Station der UNAM erreicht, endet die Asphaltstraße und geht in eine neue (2007) Kopfsteinpflasterstraße über, die nur Fahren in Schrittgeschwindigkeit ermöglicht. Am Rande dieser Straße, die dicht am Kerngebiet des Biosphärenreservats (einem Rest tropischen Regenwaldes) und an der biologischen Station vorbei führt, wurde die genannte Art beobachtet und gesammelt. Koordinaten: 18°35.180'N; 095°04.437'W; Sammeldatum: 08. September 2007. Dieser Fundort wurde uns durch P. Ward mündlich mitgeteilt.

**Beobachtungen zum Verhalten am natürlichen Standort:** *Pseudomyrmex salvini* gehört nach derzeitigem Kenntnisstand zu den generalistischen, Baum bewohnenden Knotenameisen. Die Arbeiterinnen konnten vom Vormittag bis zum frühen Nachmittag auf niedriger bis übermannshoher Vegetation am Wegesrand in unmittelbarer Nähe der Estación de Biología Tropical de la UNAM beobachtet werden. Die Arbeiterinnen durchstreifen dabei einzeln die überwiegend aus *Syngonium sp.* und *Piper sp.* bestehende Vegetation nach Fressbarem. Die Arbeiterinnen laufen äußerst zügig über Blätter und Sprossachsen und betasten dabei die Pflanzenoberfläche unaufhörlich. Bei Störung sprinten sie ein kurzes Stück (ein bis drei cm) um dann wieder abrupt für einige Sekunden zu verharren. Kolonien sind durch bloße Beobachtung der sehr vereinzelt Arbeiterinnen nicht auffindbar. Für das Auffinden der Kolonien muss man sich eines Tricks bedienen. Dazu wird ein Tropfen einer vorbereiteten Zuckerlösung (gewöhnlicher Haushaltszucker, Saccharose; ca. 10 % w/v) mit

einer Pipette in unmittelbarer Nähe der suchenden Arbeiterin positioniert. Kaum hat die Arbeiterin den Tropfen bemerkt, beginnt sie zügig eine möglichst große Flüssigkeitsmenge aufzunehmen. Dies wird am stark anschwellenden und durchsichtig werdenden Gaster leicht erkennbar. Sobald das Tier die maximal mögliche Menge Zuckerwasser aufgenommen hat, putzt sich die Arbeiterin kurz und spurtet schließlich los. Nun muss der Weg des kleinen Tieres im dichten und dunklen Dschungel verfolgt werden. Oftmals musste den Tieren ca. 10 bis 20 Minuten nachgegangen werden und nicht selten verlor man die Arbeiterin auch mal völlig aus den Augen. Wie sich herausstellte, schlagen diese Ameisen keineswegs immer den direkten Weg zum Nest ein. Oftmals wurden große Umwege von mehreren Metern über die dichte Vegetation genommen, um dann schließlich doch in ein Nest in unmittelbarer Nähe zur Lockfutterstelle zu verschwinden. Viele Vertreter von *Pseudomyrmex* sind polydom d. h. eine Kolonie kann auf mehrere getrennte Unterschlüpfe (Nester) verteilt sein. So verhält es sich auch bei *P. salvini*. Als Nester werden abgestorbene Äste, die verlassene Bohrgänge von Käferlarven oder anderen Insekten aufweisen, bevorzugt. Die Eingangslöcher waren stets nur wenig breiter, als der Kopf einer *P. salvini*-Arbeiterin. Meist hält zumindest ein Tier an der Öffnung Wache. Unserer Beobachtung zur Folge bestehen die Kolonien aus wenigen Dutzend bis vielleicht hundert Arbeiterinnen, sowie Brut und Puppen. Die in Los Tuxtlas gesammelten Proben dienten der molekularbiologischen, sowie mikrobiologischen Untersuchung.

**Haltung im Labor:** In der Nähe von Matias Romero am Isthmus von Tehuantepec (nördlich von Salina Cruz) konnte bei der Rückreise von Los Tuxtlas eine weitere Kolonie gefunden werden. Damit ist die Umgebung von Matias Romero eine neue und damit erst die zweite bekannte Stelle, an der *P. salvini* zu finden ist. Die Kolonie konnte nach derselben Methode wie oben beschrieben gefunden werden. Eine einzelne Arbeiterin wurde gefüttert und anschließend verfolgt. Auch hier hielt sich die Kolonie in einem abgestorbenen, hohlen Ast in etwa drei Meter Höhe auf einem Baum auf. Der Ast wurde in mehrere Stücke gebrochen und diese in eine Kunststoffdose gepackt. Während der restlichen Zeit des Feldaufenthaltes in Mexiko wurden die Ameisen regelmäßig mit Wasser und Zuckerlösung versorgt. Ob sich eine Königin unter den Ameisen befand, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar. Im Labor in Deutschland wurden Glasaquarien mit den Maßen 30 cm x 20 cm x 20 cm vorbereitet. Passgenaue Plexiglasdeckel mit einem kleinen Metall-Gaze-Fenster wurden eigens angefertigt. Die Terrarien wurden mit etwas Rindenmulch, Sand und einigen dünnen Bambusrohren ausgestattet. Letztere dienen als Nistmöglichkeiten, welche bereitwillig angenommen wurden. An den Schnittflächen der Bambusrohre musste lediglich etwas weiches Mark aus dem Inneren entfernt werden. Die Arbeiterinnen entfernten anschließend

zünftig selbstständig das restliche Mark. Röhren aus Kunststoff oder Glas wurden von den Arbeiterinnen nicht angenommen. Die Terrarien wurden im Pflanzraum der Allgemeinen Botanik der Universität Duisburg-Essen aufgestellt. Der Raum verfügt über gleichmäßige 25 °C. Vierzeilige, lichtstarke Leuchtstoffröhrenbatterien über den Labortischen erlauben auch die Kultivierung von Pflanzen. Die Fütterung erfolgt mittlerweile über Zuckerlösungsspenders. Zusätzlich werden etwa zwei- bis dreimal pro Woche klein geschnittene, frische Mehlkäferlarven (*Tenebrio molitor*) und Stabschrecken (*Medauroidea extradentata*) verfüttert. Ebenso steht den Ameisen ständig frisches Wasser in einem Spender zur Verfügung. Die *P. salvini*-Kolonie befindet sich nunmehr schon seit 10 Monaten im Labor und ist auf beachtliche Größe (ca. 100 Arbeiterinnen plus Brut in etwa 20 Bambusröhren) angewachsen. Trotz der dichten Deckel gelang es den Arbeiterinnen immer wieder auszubrechen. Es wurden sogar weitere Terrarien mit anderen Ameisenarten „erobert“ und die dortigen Bambusrohre als weitere Koloniezweige genutzt. Erst ein Wassergraben um das *P. salvini*-Becken gibt nun einigermaßen Sicherheit gegenüber erneuten Ausbruchversuchen. Regelmäßig tauchen nun auch männliche Geschlechtstiere (Drohnen) auf. Das Verhalten der Arbeiterinnen entspricht den Beobachtungen im Feld: Die Arbeiterinnen streifen einzeln scheu umher und nehmen, wenn sie sich zufällig begegnen nur gelegentlich Kontakt miteinander auf. Auf lebendige Insekten reagieren die Arbeiterinnen äußerst zurückhaltend, ja ängstlich. Fühlen sich die Arbeiterinnen zu sehr gestört oder bedroht, lassen sie sich einfach fallen. Dieses Verhalten deckt sich mit Beobachtungen bei anderen *Pseudomyrmex*-Arten, dass wahrscheinlich von den Arbeiterinnen nicht aktiv Beute gemacht wird, sondern die Arbeiterinnen in erster Linie sich von Honigtau und Nektar ernähren und zusätzlich kleine tote Insekten einsammeln (Clement 2005, Clement *et al.* 2008). Das für viele andere Ameisengruppen typische einander Folgen konnte bislang bei *Pseudomyrmex* noch nicht beobachtet werden. Bemerkenswert ist allerdings noch das soziale Trageverhalten, welches auch bei *P. salvini* immer wieder beobachtet werden konnte (Duelli 1977). Dabei ergreift eine Arbeiterin eine andere bei den Mundwerkzeugen. Die getragene Arbeiterin krümmt sich dann mit ihrem Körper platz sparend über den Kopf ihrer Trägerin hinweg. Bei den Arbeiterinnen, die von Nestteil zu Nestteil (Bambusröhrchen) getragen werden, scheint es sich um Arbeiterinnen zu handeln, die nur im „Innendienst“ (Betreuung von Eiern, Larven und Puppen) tätig zu sein scheinen. Geschlechtstiere, Puppen und Larven werden ebenfalls in neu erschlossene Quartiere getragen.

***Synemosyna* sp. – eine Springspinne, die *P. salvini* imitiert:** Sowohl am Standort in Los Tuxlas, Veracruz, als auch am zweiten neuen Fundort bei Matias Romero, Oaxaca, konnte



eine bemerkenswerte Springspinne der Gattung *Synemosyna* (Hentz 1846) beobachtet werden. In Los Tuxlas konnte ein Männchen auf eben jenen *Piper*-Pflanzen beobachtet werden, auf denen wir auch *P. salvini* mit Zuckerwasser köderten. Die Ähnlichkeit in Größe, Körperform, Färbung und Verhalten war so bestechend, dass der Autor die Spinne zunächst tatsächlich für eine Ameise hielt und einen Tropfen Zuckerlösung anbot. Erst nachdem das Tier kein Interesse daran zeigte, wurde die Vortäuschung offensichtlich. Der vordere Teil des Prosoma imitiert den schwarzen Kopf von *P. salvini* und ist durch eine Einschnürung vom restlichen Prosoma abgehoben. Das vorderste Beinpaar imitiert in Aussehen und Bewegung die Antennen der Ameise. Sogar die „Knoten“ der Knotenameisen und die Segmentierung des Gasters der vorgetäuschten Ameise werden nachgeahmt. Am zweiten Standort bei Matias Romero konnte ein Weibchen dieser Springspinne gefangen werden. Das Weibchen konnte eine Weile gepflegt werden und produzierte noch in Mexiko einen Eikokon mit 7 Eiern. Anschließend verstarb das Tier. Ameisen wurden von diesem Weibchen nicht erbeutet – im Gegenteil, das Tier floh vor diesen. Fruchtfliegen wurden jedoch angenommen. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese *Synemosyna* die stachelbewehrte *P. salvini* imitiert, um selbst vor Fressfeinden geschützt zu sein (Batessche Mimikry). In Deutschland schlüpften kurz nach der Rückkehr im November 5 Jungspinnen, die noch bis zu nächsten Häutung im Eikokon verblieben. Anschließend verließen die kleinen Springspinnen den Kokon, nahmen jedoch keine der angebotenen Beutetiere (Springschwänze, Trauermücken) an und verstarben schließlich.

**Diskussion:** Die Beobachtungen in freier Wildbahn wie aus der Haltung im Labor deuten darauf hin, dass *P. salvini* sich überwiegend von zuckrigen Lösungen (Honigtau, [extrafloraler] Nektar) ernährt. Aufgrund des sehr scheuen Verhaltens werden lebende Beutetiere verschmäht, dafür aber tote Insekten durchaus eingesammelt. Dies passt gut in das Bild der bekannten, nicht mit Ameisenpflanzen obligat assoziierten Vertreter der Gattung *Pseudomyrmex*, zu denen etwa auch *P. gracilis* gerechnet werden muss (In hohen Zweigen nistende *P. gracilis*-Kolonien können nämlich mit etwas Mühe oft gefunden werden. *P. gracilis* muss daher eher als fakultativer Parasit der Ameisenakazien angesehen werden) (Clement *et al.* 2008). Baum bewohnende Ameisen wie *P. salvini* scheinen demnach als opportunistische, nicht räuberische Allesfresser zu leben, die sich überwiegend von primär (Nektar, extrafloraler Nektar) oder sekundär pflanzlicher Kost (Honigtau von Pflanzensaugern) ernähren, worauf auch Untersuchungen des Stickstoff-Isotopenverhältnisses bereits hinweisen (Davidson *et al.* 2003).

**Danksagung:** Danken möchte ich besonders meiner Kollegin Diplom-Umweltwissenschaftlerin Stefanie Kautz, mit der zusammen die Ameisen gesammelt werden konnten und von deren Erfahrung ich profitieren durfte. Für die Bereitstellung und Vorbereitung der Terrarien sei Michael Neugebauer, Technischer Assistent, Universität Duisburg-Essen, besonders herzlich gedankt.

### **Literatur**

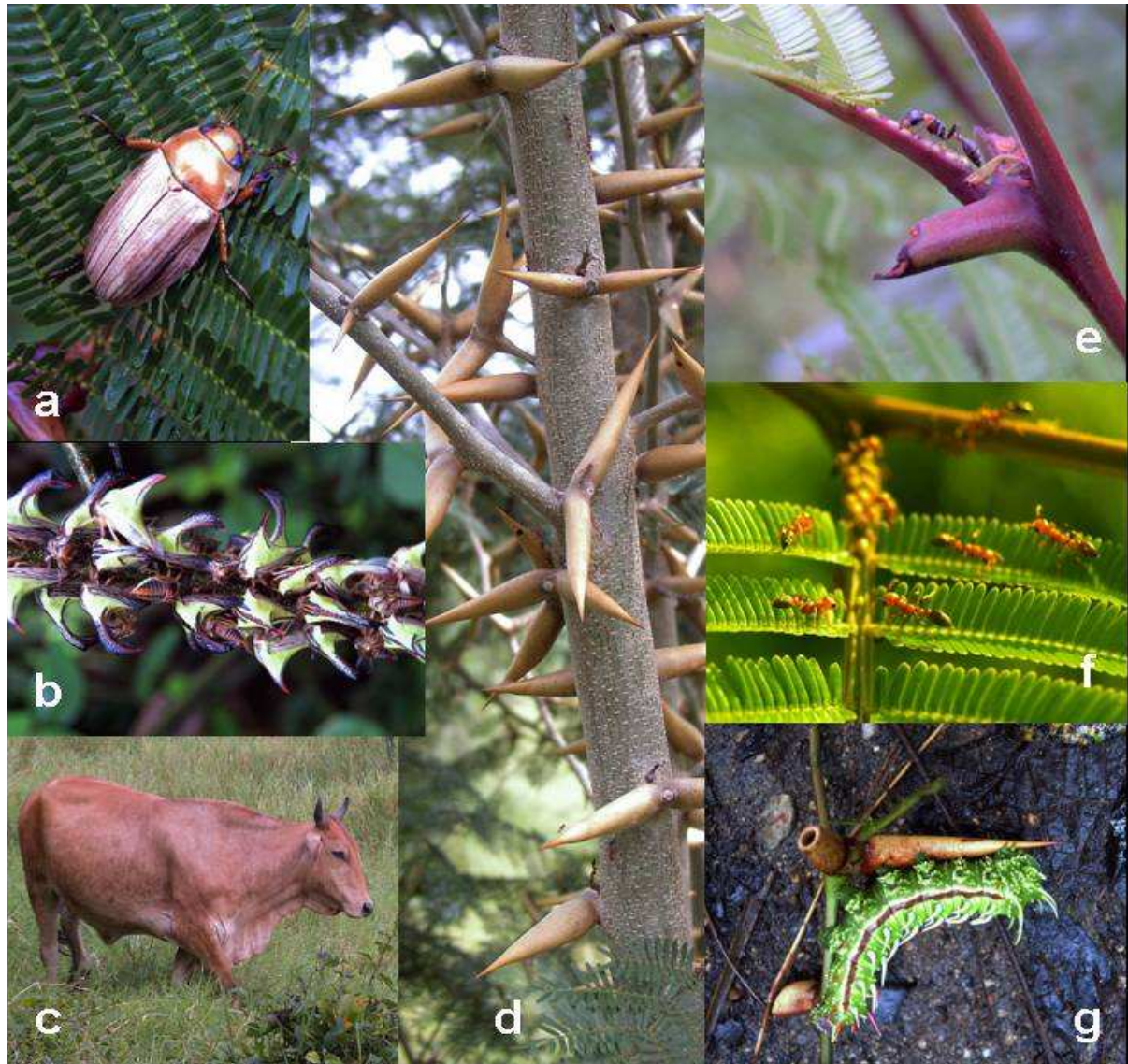
- Clement, L. W. 2005 *Pseudomyrmex gracilis* - Ein Parasit auf Ameisenakazien? *Dept. of Ecology*. Jena, Friedrich-Schiller-Universität.
- Clement, L. W., Koppen, S. C. W., Brand, W. A. & Heil, M. 2008 Strategies of a parasite of the ant-Acacia mutualism. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **62**, 953-962. (DOI 10.1007/s00265-007-0520-1.)
- Davidson, D. W., Cook, S. C., Snelling, R. R. & Chua, T. H. 2003 Explaining the abundance of ants in lowland tropical rainforest canopies. *Science*, **300**, 969-972.
- Duelli, P. 1977 Social Carrying Behavior In Neotropical Ants Genus *Pseudomyrmex* - Behavioral Pattern As A Hint For Taxonomy And Phylogeny. *Insectes Sociaux*, **24**, 359-365.
- Janzen, D. H. 1966 Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. *Evolution*, **20**, 249-275.
- Janzen, D. H. 1967 Interaction of the bull's-horn acacia (*Acacia cornigera* L.) with an ant inhabitant (*Pseudomyrmex ferruginea* F. Smith) in eastern Mexiko. *Kansas University Science Bulletin*, **47**, 315-558.
- Janzen, D. H. 1975 *Pseudomyrmex nigropilosa*: a parasite of a mutualism. *Science*, **188**, 936-937.
- Ward, P. S. 1993 Systematic studies on *Pseudomyrmex* acacia-ants (Hymenoptera: Formicidae: Pseudomyrmecinae). *J. Hymenopteran Research*, **2**, 117-168.
- Ward, P. S. 1999 Systematics, biogeography and host plant associations of the *Pseudomyrmex viduus* group (Hymenoptera: Formicidae), *Triplaris*- and *Tachigali*-inhabiting ants. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **126**, 451-540.
- Ward, P. S. & Downie, D. A. 2005 The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology*, **30**, 310-335.

## 7.4 Fotografien



**Abbildung 7.1: Ameisenakazien Südmexikos.** (a) *Acacia chiapensis*, (b) *Acacia cornigera* aus Puerto Escondido, (c) *Acacia hindsii*, (d) *Acacia cornigera*, das kleine Bild zeigt die „Büffelhornakazien“-Dornen einer lokalen Varietät von *A. cornigera* aus Los Tuxlas. Die an stammnahen Kurztrieben gebildeten Stipulardornen sind besonders voluminös, so dass diese oftmals von der Königin (den Königinnen) der Akazienameisenkolonie bewohnt werden.





**Abbildung 7.2: Ausschnitt aus der Lebensgemeinschaft um die Ameisenakazien Südmexikos.** (a) Herbivor: Blatthornkäfer, (b) phloemsaftsaugende Buckelzikaden (potenzielle Trophobionten für Ameisen), (c) Herbivor: Hausrind (d) *Acacia cornigera*, (e) fakultativ parasitische *Pseudomyrmex gracilis* beim „Nektar-Raub“ am extrafloralen Nektarium von *A. chiapensis*, (f) obligat mutualistische *Pseudomyrmex ferrugineus*, (g) spezialisierter Herbivor *Sysshinx* sp. (Saturnidae).

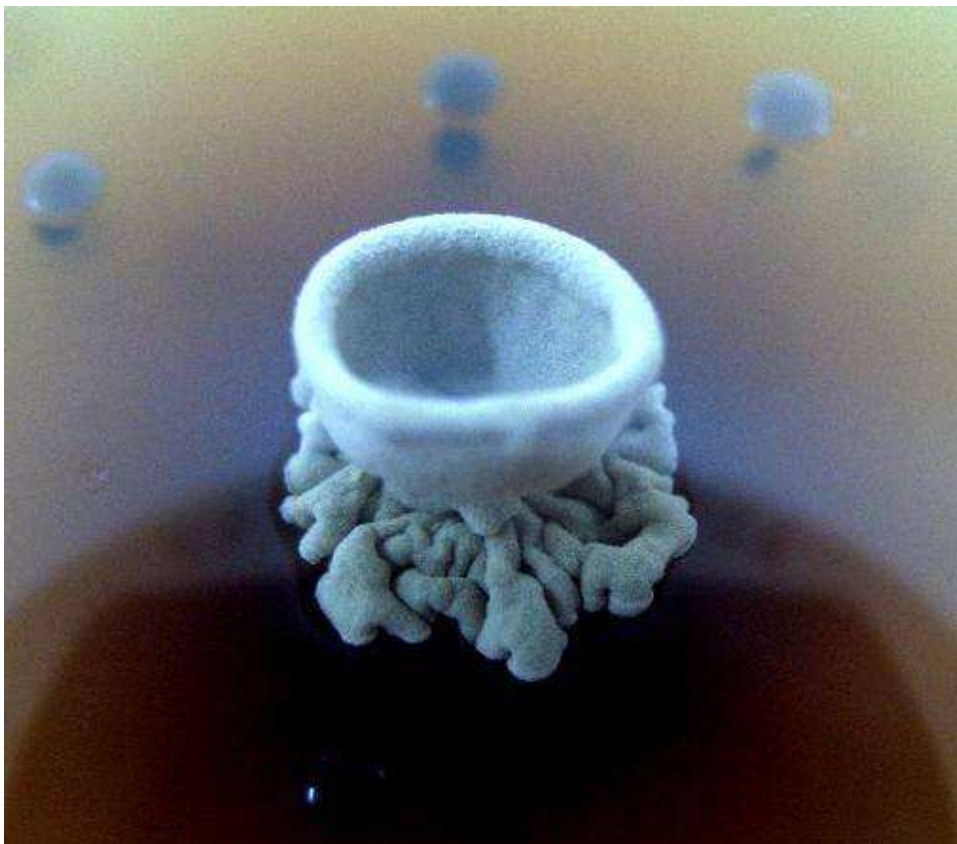


**Abbildung 7.3:** *Acacia chiapensis* mit obligat mutualistischer Akazienameise *Pseudomyrmex ferrugineus*. Die Ameisenkolonie bewohnt polydom die hohlen Stipulardorne (Domatien). Gut zu erkennen sind die hellen, warzenartigen extrafloralen Nektardrüsen an der Blattstielbasis der Blätter.



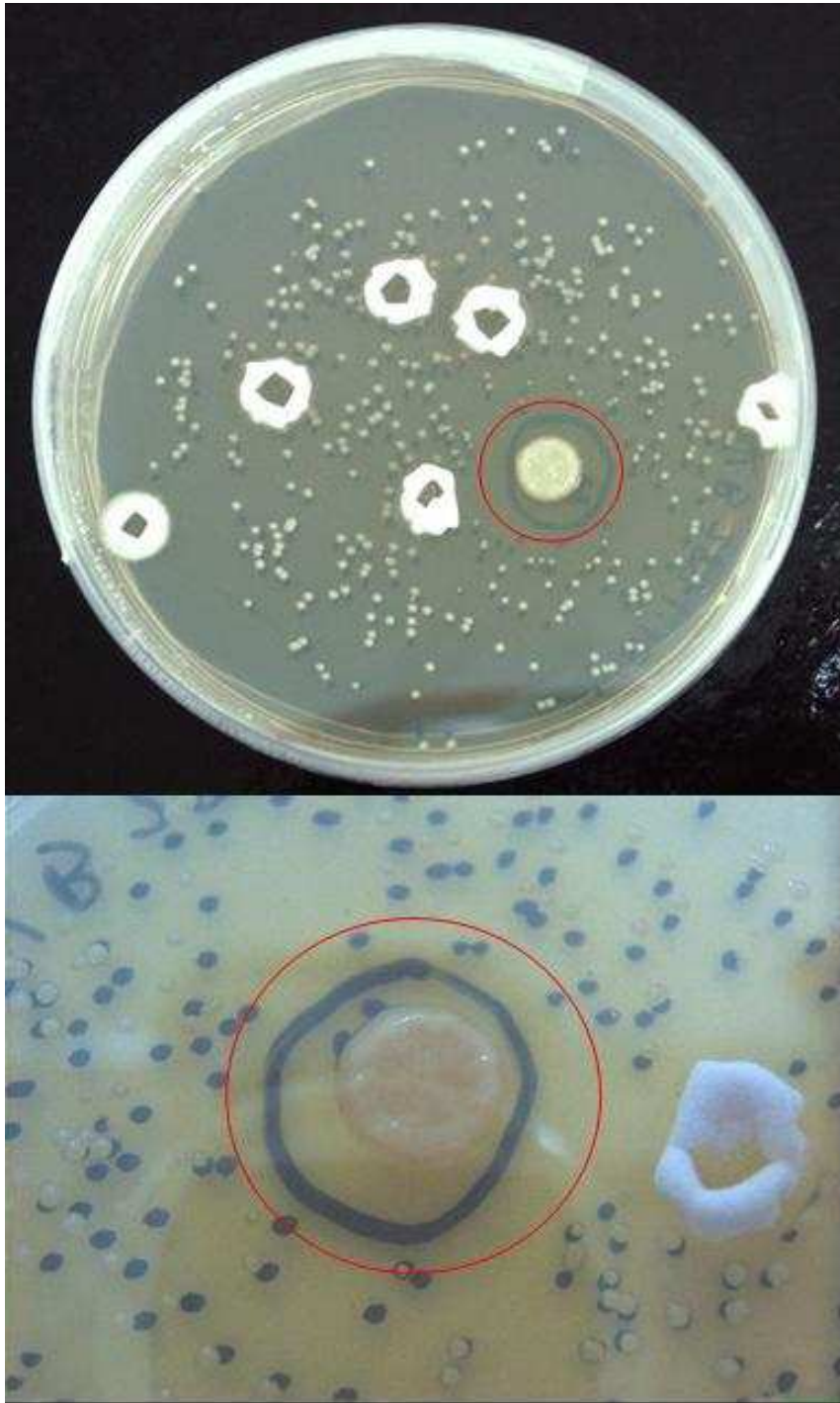


**Abbildung 7.4: Belt'sche Körperchen** an den Fiederblattspitzen eines jungen Akazienblattes. Hauptnahrung der Larven und der Königin der Partnerameisen.



**Abbildung 7.5: Bakterienisolate**

Die Abbildung zeigt eine Kolonie, die als Angehöriger der Gattung *Streptomyces* identifiziert werden konnte.



**Abbildung 7.6: Bakterienisolate**

Die Abbildung zeigt eine Kulturplatte (KB-Medium) mit Isolaten aus *P. ferrugineus*-Arbeiterinnen. Der rote Kreis markiert einen Hemmhof um ein Isolat, das als *Burkholderia* sp. identifiziert werden konnte.

## 7.5 TReFID-Ergebnistabellen

**Tabelle 7.2: Beispiel einer TReFID-Ergebnisliste I.** Ausschnitt aus einer TReFID-Ergebnisliste einer tRF-Analyse von *P. salvini*. Neben Accession-Nummer (GenBank/NCBI) und Bezeichnung (von NCBI übernommen) werden Anzahl der Fragmentlängen, die außerhalb des Größenbestimmungsbereichs (30 bp bis 500 bp) = out of range (A), Anzahl der Fragmente, die keine Schnittstelle für ein oder mehrere Enzyme aufweisen = no match (B), Übereinstimmung (Trefferwert) von vorhergesagter Fragmentlänge und Probe = score summ (C), maximal möglicher Trefferwert nach Vorhersage = maximum score (D) und prozentuale Übereinstimmung des in der Probe detektieren tRF-Musters mit dem vorhergesagten tRF-Muster des individuellen Datenbankeintrags = Similarity (E).

Nr.	Accession	Organismus	A	B	C	D	E
1	AF546951	uncultured bacterium	0	1	11,00	13,00	85 %
2	AF546928	uncultured bacterium	0	1	11,00	13,00	85 %
3	AF543312	<i>Herbaspirillum lusitanum</i>	0	1	10,00	13,00	77 %
4	X82062	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	1	10,00	13,00	77 %
5	AF431321	uncultured beta proteobacterium	0	2	10,00	13,00	77 %
6	AY133107	uncultured beta proteobacterium	0	2	10,00	13,00	77 %
7	AY133100	uncultured beta proteobacterium	0	2	10,00	13,00	77 %
8	AY043788	uncultured beta proteobacterium	0	2	10,00	13,00	77 %
9	AJ532689	uncultured beta proteobacterium	0	2	10,00	13,00	77 %
10	AJ421932	uncultured beta proteobacterium	1	1	9,75	12,00	81 %
11	AJ421928	uncultured beta proteobacterium	1	1	9,75	12,00	81 %
12	AY039472	soil bacterium NS1 Bacteria	1	1	9,75	12,00	81 %
13	AB064866	uncultured beta proteobacterium	0	1	9,50	13,00	73 %
14	AB064864	uncultured beta proteobacterium	0	1	9,50	13,00	73 %
15	AF529350	uncultured Acidobacteria bacterium	0	1	9,50	13,00	73 %
16	AY135481	<i>Microbacterium</i> sp, S5-31	1	1	9,50	12,00	79 %
17	AY095397	uncultured yard-trimming-compost	0	2	9,50	13,00	73 %
18	AF491668	uncultured beta proteobacterium	0	2	9,50	13,00	73 %
19	AJ243144	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	0	2	9,50	13,00	73 %
20	AF139880	<i>Saccharomonospora glauca</i>	2	1	9,50	11,00	86 %
21	AF139879	<i>Saccharomonospora glauca</i>	2	1	9,50	11,00	86 %
22	AY135483	<i>Pseudomonas</i> sp, CA-05	2	1	9,50	11,00	86 %
23	AJ011509	<i>Burkholderia</i> sp, IpA-51	2	1	9,50	11,00	86 %
24	AF328143	<i>Simonsiella crassa</i>	1	2	9,50	12,00	79 %
25	AF328141	<i>Simonsiella crassa</i>	1	2	9,50	12,00	79 %
26	AJ311980	<i>Pseudomonas thermotolerans</i>	1	2	9,50	12,00	79 %
27	AF431266	uncultured beta proteobacterium	0	3	9,50	13,00	73 %
28	AF489285	uncultured Bacteroidetes bacterium	1	1	9,25	12,00	77 %
29	AY123794	<i>Nitrosomonas</i> sp, Nm143	0	2	9,25	13,00	71 %
30	AJ314919	<i>Corynebacterium appendicis</i>	0	2	9,25	13,00	71 %
31	AF328142	<i>Simonsiella crassa</i>	1	2	9,25	12,00	77 %
32	U70699	uncultured gamma proteobacterium	2	0	9,00	11,00	82 %
33	AY039473	soil bacterium NS10 Bacteria	1	1	9,00	12,00	75 %
34	AB074524	<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	1	1	9,00	12,00	75 %
35	AF513101	uncultured bacterium	3	0	9,00	10,00	90 %
36	AF434951	uncultured sponge symbiont RSWS22	2	1	9,00	11,00	82 %
37	AY043811	uncultured gamma proteobacterium	2	1	9,00	11,00	82 %
38	AJ416249	uncultured bacterium	2	1	9,00	11,00	82 %
39	AJ534683	uncultured Bacteroidetes bacterium	2	1	9,00	11,00	82 %
40	U70706	uncultured beta proteobacterium	1	2	9,00	12,00	75 %
41	AF432623	uncultured bacterium	1	2	9,00	12,00	75 %



**Tabelle 7.3: Beispiel einer TReFID-Ergebnisliste II.** In diesem Abschnitt der TReFID-Ergebnislisten werden für jeden einzelnen Listeneintrag und für jedes Restriktionsenzym die erwarteten Fragmente (-längen) den detektieren Fragmenten (in bp) gegenübergestellt und die Ermittlung des Treffer (Score-) Wertes aufgeschlüsselt.

No	Accession	Organism	Out of range	No match	Score
1	AJ421932	uncultured be	1	0	11.00
		enzyme	expected	found	score
		/AluI:	203	202.04	1.00
		/Bme1390I:	46	46.32	1.00
		/Bsh1236I:	174	173.52	1.00
		/Cfr13I:	287	285.63	1.00
		/HaeIII:	188	187.10	1.00
		/Hin6I:	334	332.60	1.00
		/Hinfl:	158	156.98	0.50
		/Mbol:	236	236.02	1.00
		/Mspl:	90	89.14	0.50
		/RsaI:	87	86.54	1.00
		/Tail:	87	86.62	1.00
		/TaqI:	(no site)	(no site)	0.00
		/TasI:	318	316.65	1.00
2	AJ421928	uncultured be	1	0	11.00
		enzyme	expected	found	score
		/AluI:	203	202.04	1.00
		/Bme1390I:	46	46.32	1.00
		/Bsh1236I:	174	173.52	1.00
		/Cfr13I:	287	285.63	1.00
		/HaeIII:	188	187.10	1.00
		/Hin6I:	334	332.60	1.00
		/Hinfl:	158	156.98	0.50
		/Mbol:	236	236.02	1.00
		/Mspl:	90	89.14	0.50
		/RsaI:	87	86.54	1.00
		/Tail:	87	86.62	1.00
		/TaqI:	699 (out of range)		0.00
		/TasI:	318	316.65	1.00
3	AF328143	Simonsiella cr	1	1	11.00
		enzyme	expected	found	score
		/AluI:	122	121.69	1.00
		/Bme1390I:	46	46.32	1.00
		/Bsh1236I:	173	173.52	1.00
		/Cfr13I:	286	285.63	1.00
		/HaeIII:	187	187.10	1.00
		/Hin6I:	173	173.61	1.00
		/Hinfl:	292	290.79	1.00
		/Mbol:	235	236.02	1.00
		/Mspl:	458 (no match)		0.00
		/RsaI:	87	86.54	1.00
		/Tail:	87	86.62	1.00
		/TaqI:	718 (out of range)		0.00
		/TasI:	317	316.65	1.00

**Tabelle 7.4: Beispiel einer TRFID-Ergebnisliste III.** Gruppierung der Listeneinträge nach tRF-Mustern (Pattern ID) und Aufschlüsselung des Fragmentmusters (in bp) nach Enzymen geordnet. -1 deklariert das Fehlen einer Restriktionsschnittstelle im analysierten Bereich. Entscheidend für die Auswertung ist die „PatternID“.

Accession:	Organism:	Clone:	Authors:	Title:	Pattern ID	AluI:	BmeI:	Bsh12I:	Cfr13I:	HaeIII:	Hin6I:	HinfI:	MboI:	MspI:	RsaI:	TaqI:	TasI:
L35481	uncultured cyanobact	Ferris,M.J.,	Ruff-I	Enrichment cult	1	-1	-1	62	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	77	-1
AY350589	crenarchaeote 768-2	Ref.1: Prokofeva,	Ref.1: Cultivate		2	-1	40	324	33	144	48	177	168	39	596	68	-1
AF441983	uncultured planctomy	Ref.1: Frias-Lope	Ref.1: Partitionir		3	-1	44	317	40	34	315	276	133	139	84	84	-1
AY913664	uncultured forest soil	Ref.1: Roesch,C.	Ref.1: Bacterial		4	-1	97	170	82	164	-1	56	158	85	-1	66	-1
AB031634	uncultured cytophaga	Ref.1: Urakawa,I	Ref.1: Character		5	-1	107	74	-1	-1	57	-1	-1	54	-1	-1	-1
AF365698	uncultured bacterium	Ref.1: Rohwer,F.	Ref.1: Corals as		6	-1	107	90	159	50	336	172	109	113	245	435	316
AF432327	uncultured Bacteroid	Ref.1: Roling,W.	Ref.1: Robust H		7	-1	107	356	285	371	56	291	234	53	-1	-1	158
AF460871	marine bacterium SIM	Ref.1: Buchan,A.	Ref.1: Dynamics		8	-1	109	76	288	290	59	294	237	109	-1	-1	-1
AF460875	marine bacterium SIM	Ref.1: Buchan,A.	Ref.1: Dynamics		8	-1	109	76	288	290	59	294	237	109	-1	-1	-1
AF460878	marine bacterium SIM	Ref.1: Buchan,A.	Ref.1: Dynamics		8	-1	109	76	288	290	59	294	237	109	-1	-1	-1
AJ421816	uncultured bacterium	Ref.1: Jacquin,J.,	Ref.1: Applicatic		9	-1	110	191	286	194	-1	292	-1	110	-1	79	-1
AB109559	Aeropyrum camini	Ref.1: Nakagawa	Ref.1: Aeropyru		10	-1	139	167	146	164	321	961	1444	514	604	67	878
AJ297444	Isosphaera aff. pallid	Ref.1: Brambilla,I	Ref.1: 16S rDNA		11	-1	234	94	174	176	43	158	-1	162	-1	124	-1
AF525961	uncultured planctomy	Ref.1: Pynaert,K.	Ref.1: Character		12	31	690	339	149	169	315	477	141	117	84	84	295
AF354615	uncultured gamma pr	Ref.1: Bano,N.	Ref.1: Phylogen		13	33	85	71	152	162	167	77	229	452	-1	-1	389
AF365814	uncultured bacterium	Ref.1: Rohwer,F.	Ref.1: Corals as		14	36	-1	328	257	-1	304	68	206	-1	389	65	93
AJ519625	uncultured gamma pr	Ref.1: Geissler,A	Ref.1: Bakteriell		15	36	87	167	152	162	167	79	229	452	606	105	507
AJ489365	Oerskovia sp. Lgg15	Ref.1: Gregory,L.	Ref.1: Character		16	37	-1	191	286	33	333	93	48	245	-1	77	-1
AF482701	Microbacterium sp. T	Ref.1: Landa,B.B	Ref.1: Competiti		17	37	-1	191	286	194	106	93	48	245	-1	77	234
AF451262	Acinetobacter sp. T4	Ref.1: Spanggaa	Ref.1: The probi		18	37	-1	353	162	217	169	80	154	-1	-1	437	-1
AY090116	uncultured Pisciricket	Ref.1: Labbe,N.,	Ref.1: Microbial		19	37	-1	354	155	165	330	289	80	108	-1	437	510
AJ517824	Acinetobacter sp. E2	Ref.1: Toth,E., H	Ref.1: Natural rr		20	37	-1	354	163	218	170	80	155	-1	-1	437	-1
AY090117	uncultured Pisciricket	Ref.1: Labbe,N.,	Ref.1: Microbial		21	37	-1	356	155	167	528	291	80	457	-1	439	512
AY090124	uncultured epsilon pr	Ref.1: Labbe,N.,	Ref.1: Microbial		22	37	-1	356	285	-1	57	291	180	432	86	167	90
AF502138	Acinetobacter bauma	Ref.1: Sarma,P.N	Ref.1: Genotypic		23	37	45	-1	163	-1	118	48	155	45	-1	107	-1
AF502423	Pseudomonas aerugi	Ref.1: De Souza,	Ref.1: Conserva		24	37	45	-1	163	-1	118	48	155	108	-1	107	-1
AF531854	Acinetobacter bauma	Ref.1: Sarma,P.N	Ref.1: Genotypic		25	37	45	354	163	218	118	48	155	108	-1	107	-1
AF531855	Acinetobacter bauma	Ref.1: Sarma,P.N	Ref.1: Genotypic		25	37	45	354	163	218	118	48	155	108	-1	107	-1
U70698	uncultured gamma pr	Ref.1: Rappe,M.	Ref.1: Phylogen		25	37	45	354	163	218	118	48	155	108	-1	107	-1
AY074894	Pseudomonas aerugi	Ref.1: Gohar,Y.M	Ref.1: Partial se		26	37	45	354	163	218	118	48	155	108	-1	107	508

**Tabelle 7.5: Listenausschnitt - Ribosomal Database Project II.**  
<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>.

AJ421932_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Nitrosomonadales	62%	Gallionellaceae	62%	Gallionella	62%
AJ421928_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Nitrosomonadales	49%	Gallionellaceae	49%	Gallionella	49%
AF328143_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Neisseriales	100%	Neisseriaceae	100%	Alysiella	100%
AF328141_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Neisseriales	100%	Neisseriaceae	100%	Alysiella	100%
AF431265_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	99%	Rhodocyclaceae	65%	Azospira	30%
AY133069_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	100%	Rhodocyclaceae	46%	Sterolibacterium	26%
AF407394_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	100%	Rhodocyclaceae	61%	Sterolibacterium	20%
AF229889_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	100%	Rhodocyclaceae	100%	Thauera	100%
AF328144_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Neisseriales	100%	Neisseriaceae	100%	Alysiella	100%
AF328142_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Neisseriales	100%	Neisseriaceae	100%	Alysiella	100%
AB042504_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteri	100%	Oceanospirillales	100%	Alcanivoraceae	100%	Alcanivorax	100%
AY061962_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Oxalobacteraceae	93%	Hermiinimonas	39%
X82062_1_Co	Root	100%	Bacteria	100%	Actinobacteria	100%	Actinobacteria	100%	Actinobacteridae	100%	Actinomycetales	100%	Corynebacterineae	100%
AF431340_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteri	100%	Xanthomonadales	100%	Xanthomonadaceae	100%	Lysobacter	58%
AJ311980_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteri	100%	Pseudomonadales	100%	Pseudomonadaceae	100%	Pseudomonas	100%
AY095377_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	88%	Rhodocyclaceae	88%	Azovibrio	27%
AY144230_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	86%	Rhodocyclaceae	86%	Denitratisoma	77%
AY144224_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	68%	Rhodocyclaceae	68%	Denitratisoma	26%
AY144220_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	76%	Rhodocyclaceae	76%	Denitratisoma	17%
AY144210_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	49%	Rhodocyclaceae	49%	Denitratisoma	11%
AF543312_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Oxalobacteraceae	100%	Herbaspirillum	100%
AF491668_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	99%	Incertae sedis 5	31%	Methylibium	21%
AF546951_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Methylophilales	63%	Methylophilaceae	63%	Methylophilus	59%
AF546928_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Methylophilales	52%	Methylophilaceae	52%	Methylophilus	43%
AY062176_1	Root	100%	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Sphingobacteria	100%	Sphingobacteriales	100%	Saprospiraceae	100%	Lewinella	100%
AF016690_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	100%	Rhodocyclaceae	100%	Propionivibrio	100%
AF390911_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Comamonadaceae	100%	Brachymonas	99%
AY050606_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Comamonadaceae	98%	Rhodoferax	93%
AY135878_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	99%	Burkholderiaceae	89%	Polynucleobacter	88%
AJ306892_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Gammaproteobacteri	100%	Oceanospirillales	100%	Halomonadaceae	100%	Halomonas	100%
AF361653_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Deltaproteobacteria	60%	Desulfuromonales	41%	Geobacteraceae	7%	Geothermobacter	5%
AJ237603_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Deltaproteobacteria	100%	Desulfobacteriales	100%	Desulfobacteraceae	100%	Desulfosarcina	100%
AY037751_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	51%	Incertae sedis 5	32%	Thiobacter	32%
AF390920_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Rhodocyclales	95%	Rhodocyclaceae	95%	Dechloromonas	23%
AY043788_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Oxalobacteraceae	100%	Herbaspirillum	96%
AJ532689_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Oxalobacteraceae	100%	Herbaspirillum	96%
AY154565_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Betaproteobacteria	100%	Burkholderiales	100%	Burkholderiaceae	100%	Burkholderia	100%
AB086624_1	Root	100%	Bacteria	100%	Bacteroidetes	100%	Sphingobacteria	100%	Sphingobacteriales	100%	Flexibacteraceae	100%	Hongiella	100%
AY162080_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhizobiales	98%	Rhodobiaceae	90%	Roseospirillum	86%
AY162078_1	Root	100%	Bacteria	100%	Proteobacteria	100%	Alphaproteobacteria	100%	Rhizobiales	77%	Rhodobiaceae	65%	Roseospirillum	63%
AJ314919_1	Root	100%	Bacteria	100%	Actinobacteria	100%	Actinobacteria	100%	Actinobacteridae	100%	Actinomycetales	100%	Corynebacterineae	100%

## 8 Lebenslauf

### Persönliches

**Dipl.-Biologe Sascha Eilmus**

Gustav-Linden-Str. 7  
40878 Ratingen  
Tel: 02102/5795525  
Mobil: 0163/7706346  
Email: sascha@eilmus.de  
Geburtsdatum: 22. Mai 1978  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung

1989 – 1995	Theodor-Heuss-Realschule in Leverkusen
1995 – 1998	Landrat-Lucas-Schule (Gymnasium) in Leverkusen; Abschluss <b>Abitur</b>
1998 – 1999	Zivildienst in den Behindertenwerkstätten in Langenfeld

### Akademische Ausbildung

Oktober 1999 – September 2001	Biologie - <b>Grundstudium</b> in Köln
Oktober 2001 – September 2003	<b>Hauptstudium</b> in Köln (Schwerpunkte Botanik, Entwicklungsbiologie, Biochemie).
September 2003 – Januar 2005	<b>Diplomarbeit:</b> <i>Diversität von Prokaryoten einer Binnensalzstelle</i> (Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Bothe, Botanisches Institut, Köln).
März 2004	<b>VAAM-Tagung</b> (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie) in Braunschweig, Teilnahme mit Poster.
Dezember 2005 – Februar 2006	<b>Belebtschlamm-Projekt</b> in Zusammenarbeit mit PD. Dr. M. Denecke, Universität Duisburg-Essen.
Januar 2006 – April 2009	<b>Promotionsstudiengang</b> an der Universität Duisburg-Essen.
August 2007 – Oktober 2007	Vierteljähriger <b>Forschungsaufenthalt</b> in <b>Mexiko</b> , Provinz Oaxaca, Zusammenarbeit mit der Universidad del Mar, Puerto Escondido, Mexiko.
November 2007	Teilnahme am <b>Westdeutschen Entomologentag</b> im Aquazoo, Düsseldorf, mit Vortrag.
August 2008	<b>ISCE-Meeting</b> (International Society of Chemical Ecology) in State College, Pennsylvania, USA, Teilnahme mit Poster.
November 2008	Teilnahme am <b>Westdeutschen Entomologentag</b> im Aquazoo, Düsseldorf, mit Vortrag.
Ab April 2009	Leiter des <b>Entomologischen Labors Bayer CropScience, Monheim am Rhein</b> ; Insektizidforschung.

## **Weitere Qualifikationen und ehrenamtliche Tätigkeiten**

Mitglied der **LNU Leverkusen**  
(Landesgemeinschaft für  
Naturschutz und Umwelt  
Ortsgruppe Leverkusen)

- Faunistische und floristische Kartierung und Monitoring
- Veranstaltung und Leitung von naturkundlichen Wanderungen
- Pflegemaßnahmen und Öffentlichkeitsarbeit

Mitarbeiter des **Kölner Zoos** von  
2001 bis 2006 als Zoobegleiter

- Ausrichtung von Führungen, Kindergeburtstagen, Info- und Sondernveranstaltungen
- Spezialgebiet: Aquaristik, Terraristik, Insektaristik, Natur- und Artenschutz

Mitglied der ARGE  
Lepidopterologen

Arbeitsgemeinschaft Rheinisch-Westfälischer Lepidopterologen;  
[www.melanagra.de](http://www.melanagra.de)

Mitglied der **VAAM**

Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie.

Referatsleiter des AStA der  
Universität zu Köln

Referatsleitung Ökologie von 2001 bis 2002

Moderator des **Insektenforums**

[www.insektenforum.com](http://www.insektenforum.com)

Betreiber der Homepage  
**Insectissima**

[www.insectissima.de](http://www.insectissima.de) ([www.eilmus.de](http://www.eilmus.de))

Mitglied der **ZAG Wirbellose**  
im Terrarium e. V.

[www.zag-wirbellose.de](http://www.zag-wirbellose.de)

Mitglied des Vereins für  
**Aquaristik, Terraristik und  
Naturkunde**  
Bayer Leverkusen e. V.

- Gruppenleitung der naturkundliche Abteilung
- Vorträge
- **VDA-Sachkundenachweis** im Bereich Terraristik.  
[www.aquaterralev.de](http://www.aquaterralev.de)

**Sprachkenntnisse**

Englisch (fließend), Latein (Grundkenntnisse)

Essen, 23. März 2009

Sascha Eilmus

## 9 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation  
selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel  
bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das  
Thema „Diversität und Funktionen der mit der Ameisengattung *Pseudomyrmex* (Lund, 1831)  
assoziierten Bakterien“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und  
den Antrag von (Name des Doktoranden) befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-  
Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen  
bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese  
Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden